



HAL
open science

Discrimination sérologique de flavivirus, étude du domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika comme cible d'anticorps spécifiques.

Jessica Denis

► **To cite this version:**

Jessica Denis. Discrimination sérologique de flavivirus, étude du domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika comme cible d'anticorps spécifiques.. Immunité adaptative. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASS078 . tel-03283374

HAL Id: tel-03283374

<https://theses.hal.science/tel-03283374v1>

Submitted on 10 Jul 2021

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.

Discrimination sérologique de
Flavivirus, étude du domaine III de la
protéine d'enveloppe du virus Zika
comme cible d'anticorps spécifiques.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à
l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Immunologie

Unité de recherche : Unité de Bactériologie et Biothérapies anti-Infectieuses et
Immunité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1
place du Général Valérie André BP73, Brétigny-sur-Orge Cedex, France

Référent : Faculté de Pharmacie

**Thèse présentée et soutenue à Brétigny-sur-Orge,
le 23 juin 2020, par**

Jessica DENIS

Composition du Jury

Audrey ESCLATINE Professeur, Université Paris Saclay	Présidente
Dimitri LAVILLETTE Professeur, Institut Pasteur de Shanghai	Rapporteur & Examineur
Stephan ZIENTARA Professeur, ANSES	Rapporteur & Examineur
Henriette DE VALK Docteur en médecine, Santé publique France	Examinatrice
Sylvain BAIZE Directeur de recherche, Institut Pasteur	Examineur
Cyril BADAUT Chargé de recherche, IRBA	Directeur de thèse
Isabelle LEPARC-GOFFART Directrice de recherche, IRBA	Co-directrice de thèse

A Honorine,

"Personne ne vient au monde avec une image précise de sa raison d'être... chacun de nous doit trouver cette raison, en avançant dans la vie et en affrontant les difficultés avec persévérance..."

Natsuki Takaya
Fruits Basket

REMERCIEMENTS

Les travaux ont été réalisés à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) au sein de l'unité de Bactériologie et Biothérapies anti-Infectieuses et Immunité (2B2I) en collaboration avec le Centre Nationale de Référence (CNR) des arbovirus et l'Institut Pasteur de Paris au sein de l'unité Environnement et Risques Infectieux (ERI). Je souhaite les remercier de leur accueil et de leur encadrement tout au long de ce doctorat.

Je souhaite également remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Au Professeur Dimitri Lavillette et l'Inspecteur général de santé publique Vétérinaire Stephan Zientara pour avoir accepté d'être rapporteur et au Professeur Audrey Esclatine, au Docteur en médecine Henriette De Valk et le Docteur Sylvain Baize.

A Cyril Badaut pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir soutenue et conseillé tout au long de mon doctorat et à Isabelle Leparc-Goffart d'avoir accepté de co-encadrer ces travaux. Je souhaite leur témoigner toute ma reconnaissance pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont apporté. A Yves Gaudin d'avoir accepté de parrainer cette thèse. A Valérie Choumet pour son encadrement, ses conseils, son aide, sa bonne humeur et sa bienveillance. A Jean-Nicolas Tournier et à Jean-Claude Manuguerra de m'avoir accueilli dans leurs unités.

A l'école du Val-de-Grâce pour avoir accepté de nous accueillir pour la soutenance et à l'université Paris-Saclay pour m'avoir formé.

A mes collègues, qui m'ont apporté conseils sur les techniques, participé à mes expérimentations dans la joie et la bonne humeur, donné un point de vue différent sur mes résultats et interprétations, ... A vous qui m'avez soutenu au plus près du cœur de métier. A Annabelle, pour tes conseils de mise au point d'ELISA ainsi qu'à Laurence, pour toutes les manipulations qui n'ont pas fonctionnées et que nous avons recommencés. A Véronique, pour ton aide précieuse sur les statistiques. A Damien, pour toutes les analyses de machine learning et intelligence artificielle. A Marie, pour nos discussions scientifiques enrichissantes, ta réactivité et ta relecture. A Manon et Laurent pour nos heures passées au P3 ensemble et l'aide précieuse que vous m'avez apportée sur les séroneutralisations. A Patrick et Bernard pour tout le travail que vous faites en sérodiagnostic des arboviroses sur lequel je me suis appuyée. A Gilda et Guillaume pour votre disponibilité et les renseignements que vous m'avez apportés. A Bruno, pour ton soutien et les discussions scientifiques que nous avons pu avoir et Sarah pour tes travaux sur les protéines recombinantes et le beau travail que nous

avons effectué ensemble. A Bernard Verrier, Céline Coiffier et Laurent Bellanger pour la confiance que vous m'avez accordée et qui aura initiée une collaboration. A David Bois, infographiste, pour le temps que vous m'avez accordé. A l'ensemble de l'unité B2I et du département 2MI pour son aide, ses conseils, son soutien et réconfort, je vous remercie.

Aux doctorants de l'IRBA pour les soirées et repas partagés et pour ces importants échanges professionnels et personnels. Au bureau des doctorants que nous avons créé. J'espère qu'il perdura et gardera sa dynamique.

A tous mes professeurs qui ont partagé leur passion de la biologie avec nous et qui m'ont fait rêver et aimer la science.

A PhilDrom pour vos corrections orthographiques.

A Ophélie et Noémie collègues de travail et amies pour les moments passés ensembles.

Le doctorat est bien plus qu'un diplôme. C'est, pour moi, une véritable leçon de vie, une leçon sur moi-même et mon entourage. C'est une aventure où l'on embarque avec soi les collègues, mais aussi notre entourage personnel. Je souhaiterais donc pour finir, vous remercier vous, qui depuis le début du cheminement êtes présent. Je voudrais remercier ma famille et mes amis qui ont su écouter mes échecs, mes doutes mais aussi mes résultats. A mon compagnon pour ton soutien, tes conseils, ton aide, ta bonne humeur, ta compréhension et ton amour au quotidien. A mes parents qui avez donné tout ce que vous pouviez pour que je puisse faire mes études. A mon père, ma mère, ma sœur, mes grands-parents et mon oncle, vous qui avez toujours été présents pour mes nombreux déménagements aux quatre coins de la France y compris pendant la canicule. A mes sœurs, mon compagnon, ma Dodo, mon beau-frère et mes amis, vous qui avez su rester patient et m'aider au mieux lors des périodes intenses. A la tribu des Karpettes pour les nombreuses heures passées ensemble bénéfiques à ma détente, mon relativisme et ma prise de recul. A vous tous, qui, de part un regard, un sourire, un rire, un petit mot, un câlin, m'avez permis de continuer et de récupérer. A ceux, qui aussi ne sont plus là. Vous aurez participé à la réussite de mon projet et je désire vous rendre hommage.

Enfin, pour finir sur une touche amusante, je remercie également mon super cheval, Basilik, d'avoir supporté non pas le poids physique mais le poids des moments difficiles et à mes ronroneuthérapeutes, Gwenn ha du et Korrigan. Dois-je remercier mon roman d'aventure qui aura permis à mon esprit de s'échapper et auquel je promets une fin d'écriture prochaine ?

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES ABREVIATIONS.....	9
INTRODUCTION.....	12
I. Avant-propos.....	12
II. Histoire des épidémies du virus Zika.....	12
III. Description du virus Zika.....	17
1. Taxonomie.....	17
2. Structure.....	17
3. Glycosylations.....	21
4. Lignages.....	21
5. Cycle de réplication virale.....	23
6. Mécanismes de résistance virale.....	27
IV. Voies de transmission du virus Zika, hôtes et réservoirs.....	28
1. Transmission vectorielle.....	28
2. Hôtes et réservoirs.....	30
3. Transmission non vectorielle.....	30
a. Transmission par voie sexuelle.....	30
b. Autres voies de transmission.....	31
V. Signes cliniques et complications d’une infection ZIKV.....	31
1. Syndrome Dengue-like.....	31
2. Atteintes neurologiques, syndrome de Guillain-Barré.....	32
3. Autres atteintes chez l’adulte.....	32
4. Syndrome congénital.....	33
VI. Traitements et prévention.....	34
1. Développement de traitements spécifique.....	34
2. Vaccin.....	35
VII. Cinétique de l’infection par le virus Zika.....	37
1. Cinétique virale.....	37
2. Cinétique de la réponse immunitaire.....	38
a. Réponse immunitaire – Préambule.....	38

a.	Activation des lymphocytes T	39
b.	Les immunoglobulines ou anticorps	41
c.	Activation des lymphocytes B	43
d.	Mémoire immunitaire	44
b.	Réponse immunitaire dans le cas d'infections par des <i>Flavivirus</i>	46
VIII.	Diagnostic des infections ZIKV	47
1.	Diagnostic moléculaire	49
2.	Diagnostic sérologique	49
IX.	Problématiques liées aux <i>Flavivirus</i>	54
1.	Séroprévalence au ZIKV	54
2.	Co-endémies	55
3.	Pathologies semblables	56
4.	Réactivité croisée, neutralisation et ADE, impact sur les infections secondaires et le diagnostic spécifique	57
a.	Neutralisation croisée et Antibody Dependant Enhancement, ADE	57
b.	Impact sur le diagnostic	61
X.	La protéine d'enveloppe, cible des anticorps	62
1.	La protéine d'enveloppe du virus Zika, la E-glycoprotéine	62
2.	La protéine recombinante DIII, une cible pour le développement d'un outil de diagnostic spécifique	65
XI.	Problématique de la thèse	66
	RESULTATS	68
I.	Développement et applications d'un outil de diagnostic sérologique spécifique des infections ZIKV chez l'Homme	68
1.	Etude des performances de l'outil de détection des IgG pour le diagnostic d'infections au ZIKV - Article 1	68
a.	Introduction	68
b.	Principaux résultats	69
c.	Conclusion de l'article	73
d.	Réactivité croisée des anticorps humains dirigés contre les <i>Flavivirus</i>	73
e.	Application de notre outil de diagnostic aux études épidémiologiques - cas concret d'un échantillon	75
2.	Application de l'ELISA basée sur la reconnaissance du ZEDIII au diagnostic de routine du CNR des arbovirus - Article 2	78

3.	Cinétique des IgM et des IgG lors d'infection ZIKV chez l'homme - impact sur la fenêtre d'emploi de l'outil de sérodiagnostic	82
a.	Introduction.....	82
b.	Matériel et méthodes.....	84
a.	Description de la cohorte	84
b.	Virus et EDIII	84
c.	Réponse des IgM et des IgG sur virions inactivés ou sur les EDIII en ELISA 84	
d.	Modélisation mathématique	85
e.	Analyses mathématiques et statistiques.....	86
c.	Résultats	86
d.	Discussion	99
e.	Contribution des auteurs.....	101
II.	Etude du pouvoir protecteur des anticorps induits par immunisation de souris AG129 avec le EDIII de ZIKV	101
1.	Introduction	101
2.	Matériel et méthodes	103
a.	Modèle animal et déclaration éthique.....	103
b.	Cellules, virus, EDIII et nanoparticules de Poly Lactic Acid.....	104
c.	Détermination de la dose virale pour l'épreuve infectieuse.....	104
d.	Schéma d'immunisation	104
e.	Conservation des organes	106
f.	Quantification de la virémie par RT-qPCR.....	106
g.	Réponse des IgG des souris immunisées aux EDIII en ELISA	106
h.	Réponse des IgG des souris immunisées à ZIKV en ELISA	106
i.	Test de séroneutralisation des virus ZIKV et DENV4	107
j.	Analyses statistiques	107
3.	Résultats.....	108
a.	Détermination de la dose de ZIKV utilisée pour l'épreuve infectieuse des souris immunisées	108
b.	Protection conférée par l'immunisation face à une épreuve infectieuse létale.....	108
c.	Reconnaissance des protéines recombinantes ou des virus par les IgG induites par immunisation avec le ZEDIII	110
d.	Capacité de séroneutralisation virale <i>in vitro</i> par les anticorps induits lors de l'immunisation avec le ZEDIII	112
4.	Discussion et conclusion	114
	DISCUSSION.....	121

REFERENCES 129

TABLE DES ABREVIATIONS

7DMA	7-deaza-2'-C-methyl-D-adenosine
A2	Modèle de suivi du composé A2 d'après une réaction monomoléculaire successive
AA	Acide aminé
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADE	Antibody-Dependent enhancement
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique brin complémentaire
ANOVA	Analysis of variance
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Asn	Asparagine
BCR	B-cell Receptor
CD4	Cluster de différenciation 4
CD8	Cluster de différenciation 8
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CE	Certification Européenne
CEA	Commissariat pour l'Energie Atomique
CETEA	Comité d'Ethique en Expérimentation Animale
CH	Constant domain from Heavy chain
CHIKV	Virus du chikungunya
CL	Constant domain from Light chain
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNR	Centre National de Référence
Conc	Concentration
Cx	Culex
D2EDIII	Domaine III de la protéine d'enveloppe du sérotype 2 du virus de la dengue
D4EDIII	Domaine III de la protéine d'enveloppe du sérotype 4 du virus de la dengue
DENV	Virus de la dengue
DENV1	Sérotype 1 du virus de la dengue
DENV2	Sérotype 2 du virus de la dengue
DENV3	Sérotype 3 du virus de la dengue
DENV4	Sérotype 4 du virus de la dengue
DI	Domaine I
DII	Domaine II
DIII	Domaine III
ECDC	L'European Centre for Disease Prevention and Control
ECP	Effets CytoPathiques
EDE	E-Dimer Epitope
EDIII	Domaine III de la protéine d'enveloppe
EDTA	Ethylène diamine tétra-acétique
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EUA	Emergency Use Authorization
FBS	Sérum de veau fœtal
FDA	Food and Drug Administration

FLE	Fusion-Loop Epitope
GBS	Syndrome de Guillain-Barré
HAS	Haute Autorité de Santé
IC	Intervalle de Confiance
IFA	Immunofluorescence
IFN- γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IQR	Intervalle InterQuartile
J max	Jour où l'intensité des anticorps est maximum
J nég	Jour ou les anticorps sont détectés négatifs
J pos	Jour où les anticorps sont détectés positifs
Kb	Kilo base
Kd	Constante d'affinité
kDa	Kilo Dalton
Kdapp	Constante d'affinité apparente
lncRNA	Long non-coding RNA
LSD	Least square difference
LT	Lymphocytes T
LTh	Lymphocytes T helper
m	Moyenne
mAb	Anticorps monoclonal
Max	Maximum
MESRI	Ministère français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation
MIA	Microsphere ImmunoAssay
Min	Minimum
ND	Non déterminé
NK	Natural killer
nm	Nanomètre
NNB	Neutralizing-non-E-binding
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAHO	Pan American Health Organisation
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
pb	Paire de base
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PDB	Protein Data Bank
PFU	Plaque-forming unit
pH	-log H
PLA	Poly Lactic Acid
PNH	Primates Non-Humains
Positivation	Taux d'anticorps devient supérieur à la limite de positivité
rDO	Rapport de Densité Optique
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RT-PCR	Rétrotranscription suivie d'une réaction en chaine de polymérisation
SEM	Déviation standard de la moyenne

SNP	Single Nucleotide Polymorphisme
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
TCID	Tissue culture infective dose
TGF- β	Transforming growth factor b \acute{e} ta
TLR	Toll Like Receptor
TMA	Transcription Mediated Amplification
TMB	3,3',5,5'-t \acute{e} tram \acute{e} thylbenzidine
TR	T-Receptor
VH	Variable domain from Heavy chain
VL	Variable domain from Light chain
VLP	Virus like particle
WNV	Virus du West Nile
YFV	Virus de la fi \grave{e} vre jaune
ZEDIII	Domaine III de la prot \acute{e} ine d'enveloppe du virus Zika
ZIKV	Virus Zika

INTRODUCTION

I. Avant-propos

Le virus Zika (ZIKV) est un virus émergent appartenant à la famille des *Flaviviridae* du genre *Flavivirus* incluant notamment les virus de la Dengue (DENV) et du West-Nile (WNV). En 1947 lors d'une étude sur la fièvre jaune, il fut pour la première fois isolé en Ouganda dans la forêt Zika à partir du sang prélevé chez des singes sentinelles Rhésus présentant un état fébrile (Dick *et al.* 1952). Depuis, plusieurs épidémies ont émergé, notamment en Afrique, en Asie et dans le Pacifique (Zanluca *et al.* 2016). Les dernières épidémies de ZIKV en Polynésie Française (2014) puis au Brésil (2016), ont permis de mettre en évidence des formes graves de pathologies avec l'apparition de syndrome de Guillain-Barré et de microcéphalies chez les fœtus et nourrissons.

ZIKV et les 4 sérotypes de DENV co-circulent sur plusieurs territoires. Ces arbovirus, virus transmis par les arthropodes hématophages tels que les moustiques, sont très présents aux Antilles, en Guyane, au Sénégal, en Côte d'Ivoire, au Gabon, en Polynésie Française et en Nouvelle Calédonie où se déroulent différentes opérations militaires françaises.

Une forte homologie de séquence et de structure est observée chez les *Flavivirus* donnant lieu à des réactions croisées fréquentes de la part des anticorps vis-à-vis des antigènes viraux. Celles-ci s'expliquent par la reconnaissance d'un épitope de séquence très proche issu d'un autre virus contre lequel l'anticorps n'a pas été initialement dirigé. Cette problématique, largement répandue pose alors un problème pour le sérodiagnostic spécifique.

L'étude de ce virus, et particulièrement le développement d'un outil de diagnostic spécifique ainsi que le développement de contre-mesures médicales, vaccin ou traitement, présente donc un intérêt pour les forces militaires françaises et plus généralement la population mondiale.

II. Histoire des épidémies du virus Zika

L'année suivant sa découverte, ZIKV a été isolé à partir de plusieurs moustiques *Aedes africanus* (Dick *et al.* 1952) et une étude séro-épidémiologique a révélé que 6,1% des habitants présentaient des anticorps neutralisants ZIKV (Dick 1952), signature d'une circulation du virus en Ouganda. Par la suite d'autres études séro-épidémiologiques chez l'homme ont suggéré une circulation du virus de l'Afrique jusqu'au sud de l'Asie avec la mise

en évidence de sa neutralisation par les sérums notamment en Egypte (Smithburn *et al.* 1954b), en Inde (Smithburn *et al.* 1954a), en Thaïlande (Pond 1963), en Malaisie (Pond 1963; Smithburn 1954), au nord du Vietnam (Pond 1963), en Indonésie (Olson *et al.* 1981) et aux Philippines (Hammon *et al.* 1958).

Ce n'est qu'en 2007 que la première épidémie de ZIKV est détectée. Les médecins des Îles de Yap, situées dans les États fédérés de Micronésie, rapportent une épidémie d'éruption cutanée, conjonctivite, arthralgie, arthrite et de fièvres subjectives. Les premiers tests de diagnostic rapides suggèrent une épidémie de DENV mais les symptômes observés sont différents de ceux de l'épidémie survenue en 2004 dans ces Îles (Durand *et al.* 2005). Les échantillons sont alors envoyés au laboratoire de diagnostic des arbovirus, au Center for Disease Control and Prevention (CDC, FortCollins, CO, USA), qui identifie le génome de ZIKV par PCR et séquençage (Duffy *et al.* 2009; Lanciotti *et al.* 2008). Cette souche appartient au lignage asiatique et proviendrait de Malaisie avec 95,7% d'identité en nucléotides (Haddow *et al.* 2012). On estime que cette épidémie a touché les trois-quarts de la population des Îles Yap avec plus de 900 personnes déclarant des symptômes. Cependant, durant cette épidémie il n'y eut aucun décès ni hospitalisations dues à ZIKV (Duffy *et al.* 2009).

En 2013, une deuxième épidémie ZIKV s'est déclarée en Polynésie Française de façon concomitante avec une épidémie des sérotypes 1 et 3 de DENV. Lors de cette épidémie il a été mis en lumière l'association d'une infection ZIKV à de sévères complications neurologiques et auto-immune, notamment des encéphalites, méningo-encéphalites ou encore le syndrome de Guillain-Barré (GBS) (Bulletin dengue PF 24/01/14 2014; Oehler *et al.* 2014). La morbidité de cette épidémie est estimée à plus de 30 000 patients (Bulletin dengue PF 28/03/14 2014) avec 73 cas de complication neurologiques et immunologiques dont 42 cas de GBS mais aucun décès signalé (Bulletin dengue PF 28/02/14 2014). La souche responsable de cette épidémie était aussi proche phylogénétiquement de celle de Malaisie (Cao-Lormeau *et al.* 2014 ; Wang *et al.* 2016a) 95,6% d'identité en nucléotides.

Quelques mois plus tard, en janvier 2014, une transmission autochtone de ZIKV est confirmée dans l'Île de Pâques, petite île chilienne de 3860 habitants située à l'est de la Polynésie Française, dans le sud du Pacifique. La souche circulante, très proche phylogénétiquement de celle de l'épidémie de Polynésie Française (99,8 à 99,9% d'homologie de séquence du gène NS5 en nucléotides), fut à l'origine de 51 cas confirmés

entre janvier et mai 2014, signant alors la première épidémie autochtone de ZIKV sur le continent américain (Tognarelli *et al.* 2016). Dans le même temps, deux autres épidémies dues à la souche de Polynésie Française furent déclarées en février et mars 2014 en Nouvelle-Calédonie et dans les Îles Cook. Environ 1400 cas seront confirmés sur le territoire d'outremer français et 49 pour l'archipel de la Nouvelle-Zélande (Dupont-Rouzeyrol *et al.* 2015 ; Musso *et al.* 2016).

En février 2015, plusieurs cas de syndromes fébriles comprenant des éruptions cutanées, des fièvres, des douleurs musculaires et articulaires et des maux de têtes dans le nord-est du Brésil ont alerté les autorités sanitaires. Certains diagnostics ont alors confirmé une infection due à la DENV tandis que tous les prélèvements étaient négatifs pour les virus du chikungunya, la Rubéole ou la Rougeole (PAHO 2016).

En mai 2015, plusieurs patients se sont présentés dans les services de santé publique de Natal (Rio Grande do Norte) au Brésil avec un syndrome « dengue-like » et les résultats du laboratoire indiquaient que ni la DENV ni le virus du chikungunya n'étaient en cause. Les symptômes cliniques étant compatibles avec une infection ZIKV, le séquençage de la région codant la protéine d'enveloppe a permis à nouveau de confirmer une circulation de la souche ZIKV de Polynésie Française (Zanluca *et al.* 2015). Cette nouvelle épidémie fut à l'origine, comme en 2013, de cas de complications neurologiques, dont le GBS, associés à une éruption cutanée. En plus de ces complications neurologiques sévères déjà connues, elle a mis en lumière (i) l'association du virus avec des malformations fœtales comme le développement de microcéphalies, (ii) le décès ainsi (iii) qu'une nouvelle voie de transmission du virus, inhabituelle pour un arbovirus, la voie sexuelle. L'épidémie a continué de s'étendre rapidement à toute l'Amérique latine et les Etats-Unis (PAHO 2016). Face à cette épidémie, l'augmentation des cas de microcéphalies et les atteintes neurologiques, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a déclaré le 1^{er} février 2016 une situation d'urgence de santé publique mondiale (WHO (I) 2016). Entre mai 2015 et décembre 2016, plus de 700 000 cas d'infection autochtones ZIKV ont été déclarés, c'est la plus grande épidémie de ZIKV enregistrée (Ikejezie *et al.* 2017).

A la suite de cette épidémie, quelques cas d'infections ZIKV ont été identifiés en Angola. Le séquençage du génome a permis d'identifier la souche circulante comme provenant du continent américain signant le retour de la souche virale en Afrique (Hill *et al.* 2019).

La figure 1 présente la distribution géographique et temporelle des circulations autochtones et des grandes épidémies de ZIKV. En avril 2019, l'European Centre for Disease Prevention and Control ECDC a actualisé la liste des pays concernés par ZIKV. En 2018 et début 2019, 11 pays étaient encore concernés par une transmission et circulation active de ZIKV avec cependant beaucoup moins de cas (ECDC 2019).

III. Description du virus Zika

1. Taxonomie

ZIKV fait partie du groupe IV de la classification Baltimore et selon l'International Committee on Taxonomy of Viruses il appartient au domaine des *Riboviria*. Il fait partie de la famille des *Flaviviridae*, du genre *Flavivirus* et de l'espèce *Zika virus*.

Le nom arbovirus, communément employé, est utilisé pour les virus transmis par les arthropodes hématophages tels que les moustiques, les puces, les tiques, *etc.* On y retrouve des virus de différentes familles (*Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et *Bunyaviridae*).

2. Structure

ZIKV est un virus enveloppé contenant un ARN simple brin de polarité positive. Son génome, d'environ 10,8 kb (Kuno *et al.* 2007) est non-segmenté et encadré de deux régions non traduites, en 5' de 107 nucléotides et en 3' de 428 nucléotides. Le génome est traduit en une seule polyprotéine de séquence 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' qui sera clivée par les enzymes virales et cellulaires en trois protéines de structure qui forment le virion (capside (C), pré-membrane (prM) / membrane (M) et enveloppe (E)) et sept protéines Non-Structurales (NS1 à 5) impliquées dans le complexe de réplication virale et l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte (Kuno *et al.* 2007 ; Sirohi *et al.* 2016) (Figure 2). Ces protéines ont différentes localisations cellulaires, fonctions et interviennent en coordination à différentes étapes du cycle viral (Klema *et al.* 2015 ; Kostyuchenko *et al.* 2016 ; Roby *et al.* 2012; Sirohi *et al.* 2017; UniProt 2016) :

- La protéine C : 104 Acides Aminés (AA), 11,73 kDa, 180 copies par virus. En interagissant avec la membrane du réticulum endoplasmique et l'ARN viral, elle va former la nucléocapside et participer au bourgeonnement formant ainsi la base du virion. Elle peut également migrer dans le noyau pour moduler l'activité de la cellule.
- La protéine prM, protéine pré-membrane, est une protéine chaperonne de la protéine E et participerait au bourgeonnement du virion en interagissant avec la protéine C. Le peptide pr (93 AA, 10,52 kDa) recouvre et protège la boucle de fusion de la protéine E des faibles pH prévenant ainsi une fusion membranaire prématurée. Il est clivé au cours de la maturation du virion induisant un changement de conformation des protéines E à la surface du virion. Le peptide pr reste en interaction avec la protéine E

jusqu'au relargage dans le milieu extracellulaire, en même temps que le virion, où le pH neutre permet son relargage. Il ne reste à la surface du virion que la protéine M (75 AA, 8,52 kDa, 180 copies par virus) enchâssée dans la membrane et qui interagirait avec la protéine C.

- La protéine E ou E-glycoprotéine (500 AA, 54,09 kDa, 180 copies par virus) intervient dans la formation du virion et le bourgeonnement. Elle est retrouvée à la surface du virion sous forme dimérique chaque monomère étant constitué de 3 domaines nommés Domaine I (DI), Domaine II (DII) et Domaine III (DIII) (Kostyuchenko *et al.* 2016). Elle intervient dans l'adhésion du virion aux cellules, en interagissant avec les récepteurs cellulaires, et dans la fusion des membranes virale et cellulaire après endocytose. Un chapitre est dédié à cette protéine d'intérêt dans ce manuscrit, paragraphe IX.4.
- La protéine NS1 : 352 AA, 40,08 kDa. Elle existe sous 3 formes, soit (i) en dimère lié à la membrane du réticulum endoplasmique dans le complexe de réplication, soit (ii) dans la membrane cellulaire, soit (iii) sous forme d'hexamère excrété. A la membrane du réticulum endoplasmique elle est impliquée dans la réplication et l'assemblage du virion en participant à la formation du complexe de réplication et au recrutement des autres protéines non structurales, tandis qu'à la surface de la cellule elle est impliquée dans la transduction du signal. Sous sa forme excrétée elle est impliquée dans l'échappement immunitaire et la pathogénèse.
- La protéine NS2A (226 AA, 23,97 kDa) est impliquée dans la réplication et l'assemblage du virion ainsi que dans l'inhibition de la réponse aux interférons.
- La protéine NS2B (130 AA, 13,78 kDa) est un cofacteur de la protéine NS3 et est impliquée dans le clivage de la polyprotéine virale.
- La protéine NS3 (617 AA, 68,42 kDa) a plusieurs rôles. Dans sa partie amino-terminale se trouve une fonction sérine protéase et en carboxy-terminal une fonction hélicase. Elle est impliquée dans le clivage de la polyprotéine virale et son domaine hélicase possède plusieurs fonctionnalités : Hélicase à ARN double-brin (ARN double-brin intermédiaire formé lors de la synthèse du génome), ARN-5' triphosphatase (requis pour la synthèse de la coiffe en 5' de l'ARN) et une hydrolase des nucléosides triphosphates stimulée par l'ARN. Elle intervient dans le cytoplasme, dans les vésicules de répliquons dérivées de la membrane du réticulum endoplasmique et le complexe de réplication.

- La protéine NS4A (127 AA, 13,7 kDa) intervient dans le remodelage de la membrane, l'assemblage du complexe de réplication viral en interagissant avec plusieurs protéines NS du complexe et dans la modulation de l'immunité innée.
- La protéine NS4B (251 AA, 26,95 kDa) induit la formation des vésicules dérivées de la membrane du réticulum endoplasmique dans lesquelles se forme le complexe de réplication. Elle intervient également dans le complexe de réplication virale et dans l'inhibition du signal interféron de type I au niveau du noyau cellulaire.
- La protéine NS5 (903 AA, 103,03 kDa) a plusieurs rôles. Dans sa partie amino-terminale elle a une fonction de méthyltransférase et en carboxy-terminal, une fonction ARN polymérase ARN-dépendante. La méthyltransférase possède des activités ARN guanylyltransférase et méthyltransférase nécessaires à la synthèse et la méthylation de la coiffe en 5' de l'ARN. La polymérase est quant à elle impliquée dans la réplication du génome. Elle agit également comme un puissant antagoniste des interférons au niveau du noyau cellulaire.

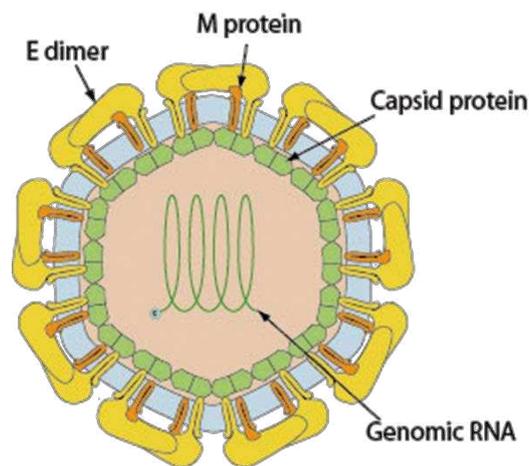


Figure 2. Structure schématique de ZIKV (ViralZone ExPASy).

Au cours du cycle viral détaillé dans le chapitre suivant, le virion passe par 2 stades caractérisés par des morphologies et des structures distinctes. Le virion immature, qui possède encore le peptide pr dans la protéine de membrane, mesure 60 nm alors que le virion mature mesure 50 nm (Sirohi *et al.* 2017) (Figure 3).

Au sein du virion mature, les protéines E et M sont organisées selon une symétrie icosaédrique. La protéine M se trouve parallèle et en dessous de la protéine E et confère au virion mature une surface lisse (Kostyuchenko *et al.* 2016 ; Sirohi *et al.* 2017). A la surface du virion, les monomères de protéine E sont associés en dimères. Trois de ces dimères alignés

parallèlement sous forme de raft composent une unité, divisible en deux sous-unités asymétriques, et sont présentes 30 fois à la surface du virion (Kostyuchenko *et al.* 2016). A l'inverse, le virion immature présente une surface « pointue » due au regroupement des prM-E en hétérotrimères, projetant vers l'extérieur l'extrémité de la protéine E recouverte du peptide pr (de la prM) protégeant ainsi les boucles de fusion et évitant une fusion des protéines prématurées (Sirohi *et al.* 2017) (Figure 3).

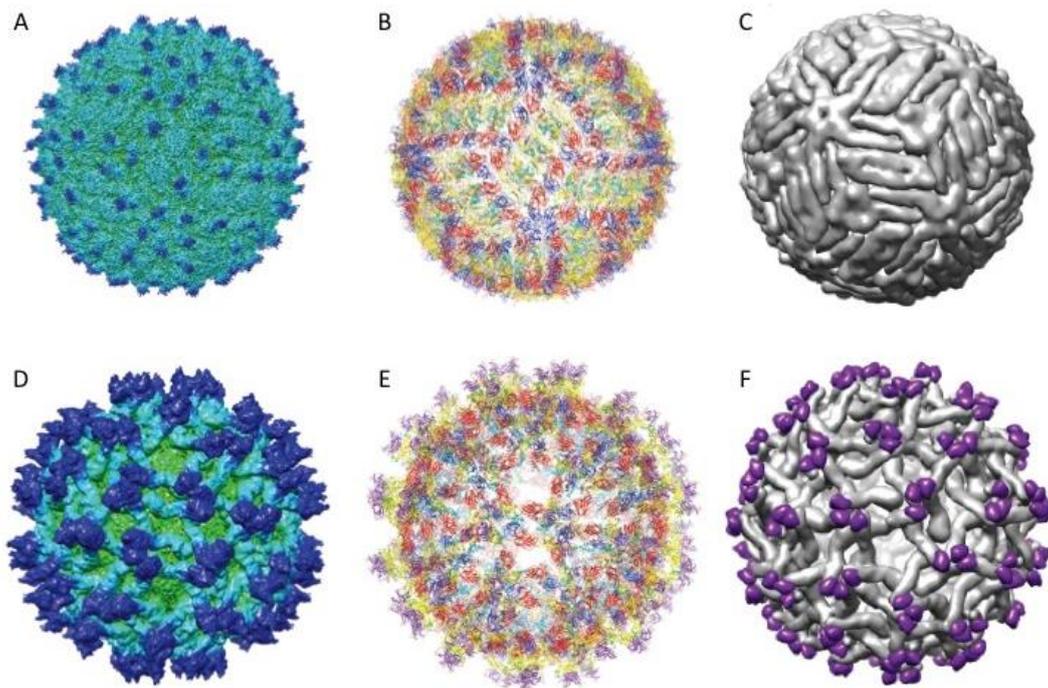


Figure 3. Structures des virions matures de ZIKV à une résolution de 3,8 Å (A, B et C) et des virions immatures de ZIKV à une résolution de 9,1 Å (D, E et F). (A, D) Représentation de la surface des virions colorés matures (numéro d'accèsion Electron Microscopy Data Bank [EMDB] : EMD-8116, numéro d'accèsion Protein Data Bank [PDB] : 5IRE) et immatures (numéro d'accèsion EMDB : EMD-8508, numéro d'accèsion PDB : 5U4W). (B) Représentation de la disposition icosaédrique et l'organisation des protéines E et M à la surface du virion mature (PDB : 5IRE). Deux unités asymétriques composées d'un raft de 3 dimères de la protéine E alignés parallèlement sont répétées 30 fois à la surface du virion. (E) Représentation de la disposition icosaédrique et l'organisation des protéines E et M à la surface du virion immature (PDB 5U4W). La protéine E est colorée selon le code couleur standard de la protéine E : domaine I (rouge), domaine II (jaune), boucle de fusion (vert), domaine III (bleu), domaine transmembranaires de la protéine E (rose), peptide pr (violet) et le domaine transmembranaire de la protéine M (cyan). Les glycanes présents à la surface des protéines prM et E sont représentés. Pour une meilleure représentation, la protéine E est

représentée dans la Figure 12. (C et F) Représentation schématique des états conformationnels des glycoprotéines de surface (prM / M, E) suite au clivage du peptide pr, par la protéase furine de l'hôte, au cours de la voie de sécrétion où le virus immature en épi et non infectieux (F) est converti en un virus mature lisse et infectieux (C). (Sirohi *et al.* 2017)

3. Glycosylations

Les protéines virales de ZIKV présentent 2 types de glycosylation : la O-Glycosylation qui est peu étudiée et la N-Glycosylation qui est plus conservée (May *et al.* 2016).

Une N-Glycosylation est située sur le résidu Asparagine 154, dans une boucle du DI de la protéine d'enveloppe. Cette boucle glycosylée, appelée boucle 150, se trouve à proximité de la boucle de fusion du second monomère et pourrait contrôler l'accès des solvants à la boucle de fusion (Rey *et al.* 2018; Sirohi *et al.* 2016). Elle est majoritairement absente chez les souches africaines mais présente chez les souches asiatiques (May *et al.* 2016). Elle est impliquée dans la virulence (Faye *et al.* 2014). Cette glycosylation est impliquée dans la progression des virions dans la voie de sécrétion mais également pour la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes de l'endosome. Ce phénomène influe sur la production et l'infectivité du virus aussi bien chez les moustiques que chez les mammifères (Fontes-Garfias *et al.* 2017; Mossenta *et al.* 2017). Cette glycosylation serait également impliquée dans l'échappement immunitaire. Cette glycosylation est connue pour être impliquée dans la neurovirulence du WNV (Beasley *et al.* 2005) mais ces résultats sont discordants pour ZIKV (Annamalai *et al.* 2017 ; Carbaugh *et al.* 2019; Fontes-Garfias *et al.* 2017).

Trois autre N-glycosylation ont été décrites, une présente sur le résidu Asparagine 70 du peptide pr, éliminée durant le processus de maturation (Sirohi *et al.* 2017) et deux autres présentes sur des asparagines de la protéine NS1 en position 130 et 207, acides aminés conservés au sein des *Flavivirus* (Xu *et al.* 2016b).

Les O-Glycosylations sont beaucoup plus difficiles à étudier par manque d'enzymes spécifiques, cependant deux études ont révélés la présence d'un grand nombre d'O-Glycosylations sur les protéines E et NS1 (Faye *et al.* 2014 ; Yang *et al.* 2018).

4. Lignages

Les analyses phylogénétiques basées sur le séquençage des gènes codant pour les protéines E, NS3 et NS5 de ZIKV ont permis d'identifier 3 à 4 lignages différents selon les

études : Afrique de l'Est, Afrique de l'Ouest, Asie (Faye *et al.* 2014 ; Lanciotti *et al.* 2008 ; May *et al.* 2016) et Afrique Centrale (Lednicky *et al.* 2016). Une étude basée sur le principe de l'horloge moléculaire montre que l'ancêtre commun le plus récent du lignage africain circulait depuis au moins le début des années 1900 et celui du lignage asiatique depuis au moins 1956. Selon ce même principe, le lignage de l'Afrique de l'Est et de l'Afrique Centrale se sépare aux alentours des années 1940 (Lednicky *et al.* 2016), le lignage de l'Afrique de l'Est est alors représenté par la souche d'origine de l'Ouganda (MR 766) (Faye *et al.* 2014). Les lignages de l'Afrique Centrale et de l'Afrique de l'Ouest se séparent à leur tour au milieu des années 1950 (Lednicky *et al.* 2016).

Le séquençage des souches a permis de déterminer une identité génétique de 93 % et de 97,8 % en acides aminés entre les deux lignages africains. En revanche, l'identité observée entre les lignages africains et asiatiques est plus faible, on observe 89,8 % d'identité génétique et 96,9 % d'identité en acides aminés entre le lignage asiatique et le lignage d'Afrique de l'Est et 89,7% et 96,9% avec le lignage d'Afrique de l'ouest (Haddow *et al.* 2012). L'origine de ces divergences repose sur des mutations ponctuelles acquises dans la séquence codante de la polyprotéine de ZIKV. Le taux moyen de polymorphisme nucléotidique (Single Nucleotide Polymorphisme = SNP) à travers le génome est de 22,5 substitutions pour 100 nucléotides et de 9,1 substitutions d'acides aminés pour 100 résidus. Les insertions et délétions de nucléotides sont, quant à elles, moins fréquentes, de petite taille et toujours dans le cadre de lecture (May *et al.* 2016). Le taux d'évolution du lignage asiatique est estimé à $7,26.10^{-4}$ substitutions par site par an (Pettersson *et al.* 2018).

Plusieurs études, présentées dans la revue de Simonin *et al.*, décrivent une différence de virulence et de pathogénicité entre des lignages de ZIKV. En effet, les souches africaines, présentent un taux d'infection et de réplication plus élevé que les souches asiatiques, ainsi qu'une forte induction de la mort cellulaire précoce. Elles entraînent également des réponses cellulaires différentes, au niveau du cycle cellulaire ou de la réponse antivirale, ce qui pourrait entraîner des différences physiopathologiques *in vivo*. Le lignage Africain entraînerait des infections aiguës alors que le lignage asiatique persisterait plus longtemps dans l'organisme notamment au niveau du système nerveux central (Simonin *et al.* 2016 ; Simonin *et al.* 2017).

5. Cycle de réplication virale

Il est estimé que le cycle de réplication viral est le même pour tous les *Flavivirus*. Il a été décrit majoritairement chez DENV et de nombreuses publications présentées dans ce chapitre y font référence.

ZIKV est inoculé, lors d'une piqûre de moustique infecté, dans l'épiderme et le derme. Les premières cellules permissives sont donc celles de la première ligne de défense : les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules immunitaires de la peau (Hamel *et al.* 2015). ZIKV a un tropisme large et est capable d'infecter, lors de sa dissémination dans l'organisme, un grand nombre de types cellulaires différents. Parmi celles-ci on retrouve entre autres, les monocytes (Michlmayr *et al.* 2017), le nerf optique et plusieurs types cellulaires oculaires (Miner *et al.* 2016). De nombreuses autres études ont été réalisées *in vitro* et montrent une sensibilité des précurseurs neuronaux, des cellules souches neurales et de la moelle épinière (Li *et al.* 2016 ; Onorati *et al.* 2016), des cellules rénales (Alcendor 2017), des cellules stromales de l'endomètre (Pagani *et al.* 2017), des trophoblastes du placenta (Aagaard *et al.* 2017), des muscles, des poumons, des cellules hépatiques, du colon, de la prostate et des testicules (Chan *et al.* 2016 ; Frumence *et al.* 2016) à ZIKV.

L'entrée de ZIKV dans la cellule est permise par la protéine E (E-glycoprotéine), les glycanes et les lipides membranaires qui sont reconnus par des récepteurs, permettant l'entrée du virion dans la cellule, et par des facteurs d'attachements, permettant de retenir les virions à la surface de la cellule jusqu'à son interaction avec les récepteurs. Les facteurs d'attachements les plus communs chez les *Flavivirus* sont les glycosaminoglycanes chargés négativement (GAGs). Concernant les récepteurs cellulaires, les différents récepteurs de reconnaissance des pathogènes (Pathogen Recognition Receptor, PRR) portés par les cellules de l'immunité innée reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) comme la N-glycosylation présente dans la E-glycoprotéine. Les PRR les plus impliqués dans l'interaction avec les *Flavivirus* sont ceux de la famille des récepteurs aux lectines de type C (C-type lectin receptors) notamment DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), L-SIGN (Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin), MMR (Macrophage mannose receptor) et CLEC5A (C-type lectin member 5A). Les lipides membranaires du virion sont quant à eux reconnus par les récepteurs de la famille des TIM (TIM1, 3 et 4) et TAM (TYRO3, AXL et MER) (Agregli *et al.* 2019; Hamel *et al.* 2015 ; Nowakowski *et al.*

2016 ; Onorati *et al.* 2016). Un site de fixation aux récepteurs cellulaires est présent dans le domaine III de la protéine d'enveloppe mais le récepteur associé n'est pour le moment pas identifié. Le motif de ce site de fixation suggère une interaction possible avec les récepteurs de la famille des intégrines (Chu *et al.* 2005). L'interaction du virion avec les récepteurs entraîne un regroupement de nombreux récepteurs à la surface de la cellule qui va induire une internalisation par endocytose du virion *via* la voie des clathrines. Le faible pH de l'endosome entraîne une modification conformationnelle des protéines E permettant une exposition des boucles de fusion. Ces boucles sont des régions de la protéine E hydrophobes qui vont alors s'enchâsser dans la membrane lipidique de l'endosome et déclencher la fusion des membranes virale et cellulaire (Figure 4). S'ensuit la décapsidation permettant le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme, sa traduction en polyprotéines et son clivage par les enzymes cellulaires et virales (Modis *et al.* 2004 ; Perera *et al.* 2008).

La réplication du génome a lieu dans des vésicules de 80 à 100 nm de diamètre provenant de l'invagination de la membrane du réticulum endoplasmique. On y trouve le complexe de réplication lié à la membrane composé des protéines NS virales, de l'ARN viral et de protéines cellulaires dont toutes ne sont pas encore identifiées. Ces vésicules communiquent avec le cytoplasme *via* un pore. Dans un premier temps, l'ARN sens génomique de polarité positive (+) est utilisé comme modèle par le domaine polymérase de la protéine NS5 pour produire un ARN complémentaire de polarité négative (-). L'ARN (-) et l'ARN (+) restent appariés donnant une forme d'ARN double brin intermédiaire. Les nouveaux ARN (+) génomique sont alors synthétisés sur l'ARN (-) modèle et remplacent les ARN (+) dans le double brin d'ARN. Le double brin d'ARN repart ensuite dans la boucle de réplication pour la synthèse d'ARN (+) génomique. Le domaine hélicase de la NS3 peut être requis pour séparer le double brin d'ARN intermédiaire. L'ARN (+) génomique synthétisé est pris en charge par la NS3 et la NS5 pour synthétiser la coiffe à l'extrémité 5' (Klema *et al.* 2015) (Figure 5).

La réplication du génome viral et son encapsidation sont très coordonnées. Les virions sont assemblés à la membrane du réticulum endoplasmique à côté des vésicules de réplication (Klema *et al.* 2015). Bien que les détails de l'assemblage et du bourgeonnement ne soient pas connus, il est supposé que l'ARN (+) génomique en association avec la protéine C interagirait avec les hétérotrimères des protéines prM-E enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique et induirait le bourgeonnement des virions immatures dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les particules virales immatures sont alors glycosylées dans le

réticulum endoplasmique puis transportées dans l'appareil de Golgi et dans le Trans-Golgi où les glycanes subissent une maturation. Le pH du Trans-Golgi est suffisamment acide pour induire un réarrangement des trimères prM-E en dimères parallèles à la membrane. Ce réarrangement dévoile les sites de clivages pour la furine cellulaire qui va cliver le peptide pr de la protéine M entamant ainsi la maturation du virion. Ce peptide pr est ensuite excrété dans le milieu extracellulaire en même temps que le virion mature (Sirohi *et al.* 2017) (Figure 6).

Chez les *Flavivirus* le clivage par la furine n'est pas assez efficace et entraîne l'excrétion de virions non matures. D'autres imperfections sont observées notamment à cause d'un nombre incorrect de protéines E incorporées entraînant un mauvais arrangement à la surface du virion et des perturbations dans la structure des protéines de surfaces E et M. Ces imperfections entraînent la production de populations virales hétérogènes qui présentent un ensemble d'épitopes beaucoup plus nombreux au système immunitaire (Sirohi *et al.* 2017).

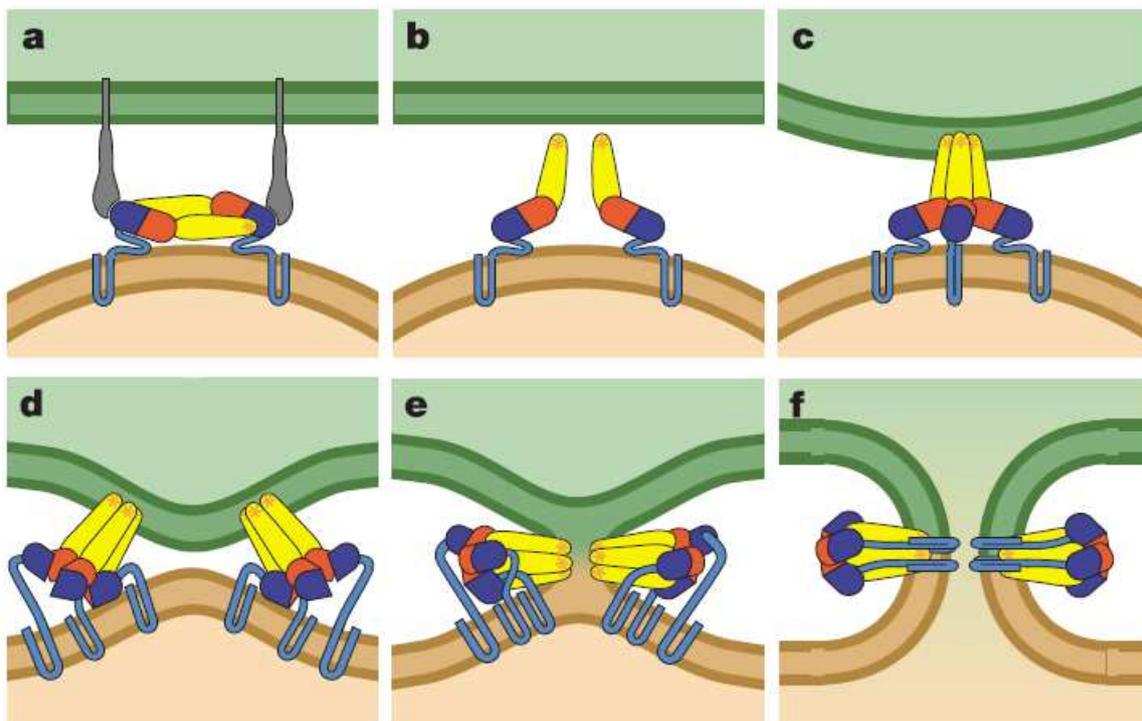


Figure 4. Représentation schématique du processus de fusion des membranes virales et endosomales. **a**, La protéine interagit avec son récepteur cellulaire déclenchant l'internalisation du virus dans un endosome. **b**, Le faible pH de l'endosome entraîne un changement conformationnel de la protéine E, le DII (jaune) bascule vers l'extérieur du virion exposant la boucle de fusion (astérisque jaune foncé) et permettant un réarrangement des

monomères de protéines E à la surface de l'enveloppe virale. **c**, La boucle de fusion hydrophobe s'enfâsse dans la membrane de l'endosome entraînant la trimérisation des protéines E partant de la boucle de fusion jusqu'à la base. **d**, Le DIII (bleu) se décale et pivote pour créer des contacts avec les autres protéines du trimère. La partie C-terminale de la protéine E va alors se replier sur la boucle de fusion entraînant les membranes avec elles. **e**, le repliement de la protéine sur elle-même entraîne une interaction entre le DII et sa partie transmembranaire aboutissant à l'hémifusion des membranes puis **f**, à la formation d'un pore lipidique. Ce processus a été décrit pour la DENV (Modis *et al.* 2004).

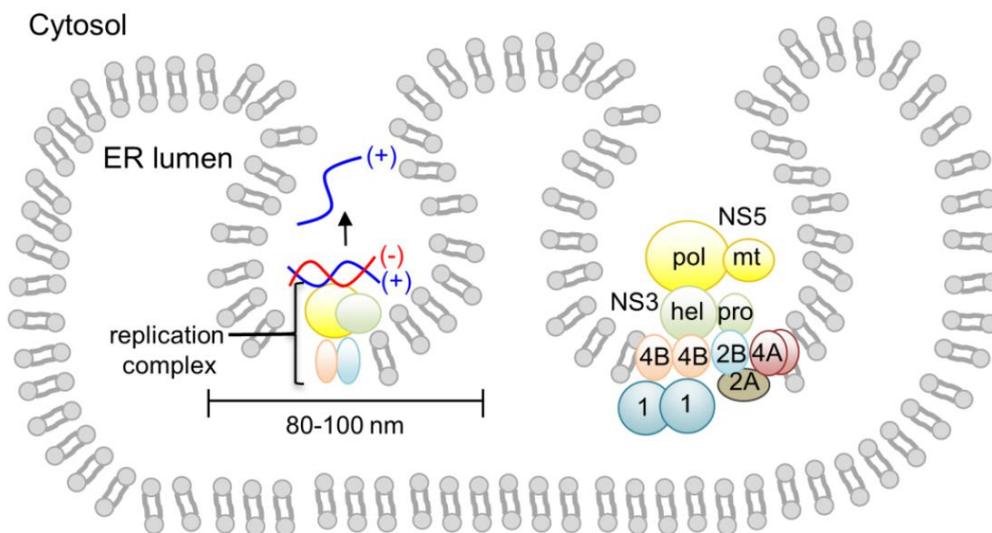


Figure 5. Complexe de réplication des *Flavivirus* enchâssé dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le complexe de réplication se trouve dans des vésicules à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique (Klema *et al.* 2015).

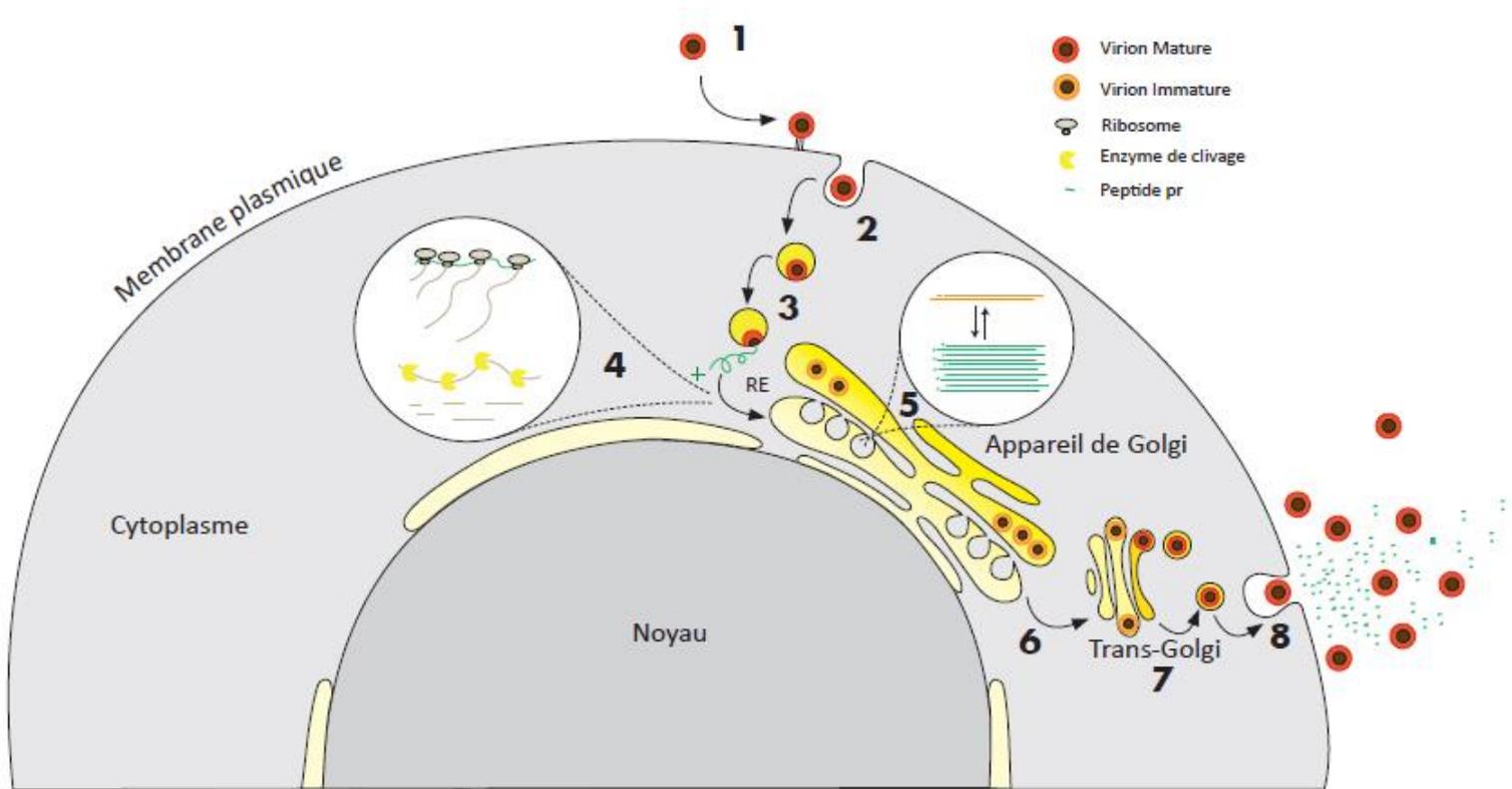


Figure 6. Cycle de réplication viral des *Flavivirus*. **1.** Adhésion. **2.** Endocytose. **3.** Fusion membranaire et décapsidation. **4.** Traduction de l'ARN viral et clivage de la polyprotéine. **5.** Réplication de l'ARN viral. **6.** Assemblage du virion immature et glycosylation du virion. **7.** Maturation du virion et des glycosylations, clivage de la prM par la furine. **8.** Relargage du virion mature et des peptides pr à l'extérieur de la cellule. Figure modifiée de l'article de Yun *et al.* (Yun *et al.* 2017).

6. Mécanismes de résistance virale

De nombreux mécanismes d'échappement immunitaire ont été sélectionnés chez les *Flavivirus* et impliquent plusieurs protéines virales ainsi que l'ARN. Certains sont présentés ci-dessous, ils sont connus chez les *Flavivirus* mais tous n'ont pas encore été démontrés chez ZIKV.

Tout d'abord, la protéine E présente une tolérance aux mutations. Cette variabilité de séquence joue un rôle primordial dans l'évasion immunitaire puisqu'elle est la cible des anticorps neutralisants (Fulton *et al.* 2017). Lors de la maturation du virion le clivage du peptide pr par la furine peut ne pas être suffisamment efficace, les protéines E restent alors

sous forme trimérique (Sirohi *et al.* 2017) masquant ainsi les épitopes aux anticorps neutralisant ce qui permet un échappement immunitaire (Nelson *et al.* 2008).

Ensuite, la protéine NS1 est associée aux membranes cellulaires et est la seule protéine virale à être sécrétée. On lui prête différents mécanismes d'action. Chez le WNV et la DENV, elle peut diminuer l'activation du complément soit en interagissant directement avec les protéines du complément soit en recrutant au site d'infection des régulateurs de l'activation des protéines du complément. Cette action prévient donc la formation du complexe d'attaque membranaire pouvant lyser les cellules infectées (Chung *et al.* 2006 ; Conde *et al.* 2016). Cette protéine est également nécessaire à la susceptibilité des moustiques aux infections flavivirales. En inhibant certains mécanismes antiviraux chez les moustiques, elle facilite l'infection des moustiques par les flavivirus suite à un repas sanguin sur un mammifère infecté et augmente ainsi la prévalence virale chez les vecteurs (Liu *et al.* 2016 ; Liu *et al.* 2017a).

La protéine NS5 intervient dans l'inhibition de la réponse aux interférons. Après stimulation des récepteurs membranaires cellulaires aux interférons par ces derniers, la transduction du signal est bloquée par NS5 qui se fixe et induit la dégradation du transducteur de signal et activateur de transcription 2 (Signal transducer and activator of transcription 2, STAT2). L'adressage de STAT2 au protéasome l'empêche d'activer la transcription des gènes en réponses aux interférons (interferon-stimulated genes) permettant ainsi la poursuite du cycle viral (Grant *et al.* 2016). Les protéines NS1 et NS4A serait également impliquées dans le processus d'inhibition de la réponse aux interférons (Kumar *et al.* 2016).

Enfin, un ARN de 413 nucléotides est transcrit à partir de la région 3' UTR du génome de ZIKV et de la DENV. Cet ARN non codant (long non-coding RNA, lncRNA) aurait une activité antagoniste sur RIG-I, médiateur de l'induction des interférons diminuant ainsi l'expression des interférons de type I, α et β (Donald *et al.* 2016).

IV. Voies de transmission du virus Zika, hôtes et réservoirs

1. Transmission vectorielle

ZIKV a tout d'abord été isolé à partir d'*Aedes africanus* l'année suivant sa découverte (Dick *et al.* 1952) mais le vecteur principal de ZIKV est *Aedes aegypti*. En 1956, Boorman *et al.* montrent qu'*Ae. aegypti* peut, après un gorgement artificiel sur peau, transmettre le virus à

un singe rhésus (Boorman *et al.* 1956) mais c'est en 1966 que Marchette *et al.* l'isole à partir de femelles infectées naturellement (Marchette *et al.* 1969).

Une deuxième espèce responsable de sa transmission, *Aedes albopictus*, communément appelé le moustique tigre, est déjà connu pour sa capacité à transmettre d'autres arbovirus : le DENV et le CHIKV. De nombreuses études récentes décrivent la présence de ZIKV dans les glandes salivaires de moustiques infectés. Les taux d'infection, de dissémination et de transmission restent plus faibles qu'avec *Ae. aegypti* en laboratoire mais une transmission autochtone à Hyères en France montre qu'*Ae. albopictus* est un vecteur de ZIKV (Chouin-Carneiro *et al.* 2016 ; Ciota *et al.* 2017 ; Giron *et al.* 2019; Grard *et al.* 2014 ; Liu *et al.* 2017b).

D'autres espèces d'*Aedes* sont impliquées dans la transmission de ZIKV, notamment *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus* et *Ae. vexans* qui pourraient potentiellement transmettre le virus puisqu'il a été détecté dans leur salive (Diagne *et al.* 2015 ; Gendernalik *et al.* 2017; O'Donnell *et al.* 2017).

Ae. luteocephalus, et *Ae. africanus* sont présents uniquement en Afrique et *Ae. vittatus* dans le sud de l'Europe et de l'Asie, et en Afrique. Ils sont maintenus dans des cycles selvatiques. *Ae. aegypti* est retrouvé dans des cycles selvatiques et urbain, *albopictus* dans des cycles urbains tandis que *vexans* est retrouvé dans les milieux ruraux. Ces trois derniers sont cosmopolites. Les femelles moustiques du genre *Aedes* sont anthropophiles et se nourrissent aussi bien en journée, en soirée ou de nuit (WRBU). *Ae. vexans* est un moustique agressif dont la femelle se nourrit sur les grands mammifères notamment les humains, aussi bien de jour comme de nuit. D'une part, sa distribution géographique et son abondance dans les latitudes nord, notamment au nord des Etats-Unis où les vecteurs conventionnels ne peuvent pas survivre et d'autre part, sa capacité à voler sur de longues distances en font un vecteur menaçant (Greenberg *et al.* 2013 ; O'Donnell *et al.* 2017).

Les nombreuses études réalisées sur les espèces *Culex* (Amraoui *et al.* 2016 ; Dodson *et al.* 2017 ; Fernandes *et al.* 2016 ; Kenney *et al.* 2017) et *Anophèles* (Dodson *et al.* 2017) s'accordent à dire que ce ne sont pas des vecteurs compétents.

Beaucoup d'études menées restent controversées à cause des protocoles expérimentaux très variés notamment la technique d'infection (gorgement artificiel ou naturel), la souche virale utilisée (souche asiatique ou africaine, fraîchement cultivée ou congelée), ainsi que

l'espèce, la population et l'origine des moustiques. Tous ces paramètres vont jouer sur la période d'incubation, le taux d'infection, le taux de dissémination, le taux de transmission et d'efficacité (Epelboin *et al.* 2017).

2. Hôtes et réservoirs

Les réservoirs de ZIKV ne sont pas encore exactement définis. Il semblerait que ZIKV soit majoritairement maintenu dans un cycle selvatique impliquant des Primates Non-Humains (PNH) et des moustiques avec des cycles épizootique chez les singes. Cette transmission singe/moustiques permet le maintien des foyers enzootiques. De nombreuses autres espèces animales présentent une cicatrice immunitaire au ZIKV ou bien sont sensibles à une infection par ce virus notamment les buffles, les hippopotames, les éléphants, les impalas, les gazelles, les kongonis, les gnous, les lions, les zèbres, les chevaux, de nombreux rongeurs, les cochons d'inde, les lapins, les sigmodons, les rats, les oiseaux, les chauves-souris, les canards, et du bétail, les chèvres ou encore les moutons (Bueno *et al.* 2016).

Dans le cycle selvatique, l'homme est donc un hôte accidentel et dans les zones dépourvues de PNH, l'homme devient certainement l'hôte primaire pour l'amplification du virus (Bueno *et al.* 2016).

3. Transmission non vectorielle

a. Transmission par voie sexuelle

ZIKV est maintenant connu pour sa transmission par voie sexuelle qui est une voie non conventionnelle pour un arbovirus. C'est en 2008, dans le nord du Colorado, que le premier cas de transmission sexuelle est suspecté. Deux scientifiques américains, travaillant au Sénégal pour un échantillonnage de moustiques dans le village de Bandafassi, contractent la maladie quelques jours après leur retour. La femme d'un des patients contracte également la maladie quelques jours après lui. La patiente n'ayant pas voyagé en Afrique ni en Asie (zones d'endémies), n'ayant pas quitté les Etats-Unis et leurs enfants n'étant pas tombés malades, la transmission par voie sexuelle est alors suspectée (Foy *et al.* 2011). C'est pendant l'épidémie de 2013 en Polynésie française que ZIKV est isolé à partir du sperme d'un patient (Musso *et al.* 2015). Pendant l'épidémie de 2015 la transmission par voie sexuelle est de nouveau confirmée par l'OMS (PAHO 2016) et différents cas sont rapportés aux Etats-Unis (Texas) (McCarthy 2016), en France (D'Ortenzio *et al.* 2016) et au Chili (WHO (II) 2016).

b. Autres voies de transmission

Des particules répliquatives de ZIKV ont été détectées dans des poches de sang de transfusion (Musso *et al.* 2014), un cas de transmission lors d'une transfusion sanguine a d'ailleurs été rapporté lors de l'épidémie de 2016 (Barjas-Castro *et al.* 2016), dans la salive (Barzon *et al.* 2016; Bonaldo *et al.* 2016) et dans le lait maternel (Blohm *et al.* 2017; Dupont-Rouzeyrol *et al.* 2016), mettant en avant la possibilité de multiples modes de transmission. La transmission périnatale par la voie transplacentaire est également possible (Besnard *et al.* 2014; Pomar *et al.* 2018), la présence de ZIKV dans le liquide amniotique d'un fœtus présentant des signes de l'infection ayant été confirmée (Calvet *et al.* 2016). La transmission périnatale pendant l'accouchement, l'allaitement au sein ou le contact étroit entre la mère et son nouveau-né restent également suspectés (Besnard *et al.* 2014). La transmission au fœtus est d'autant plus inquiétante qu'elle entraîne de graves répercussions sur son développement, dans 7 à 9% des cas des anomalies neurologiques sont observées et 1 à 4% des cas une mort fœtale (Hoen *et al.* 2018; Pomar *et al.* 2018). Une étude a calculé un taux de transmission materno-fœtale de 26% lors d'infection de la mère pendant la grossesse (Pomar *et al.* 2018).

V. Signes cliniques et complications d'une infection ZIKV

1. Syndrome Dengue-like

Les premiers signes cliniques chez l'homme ont été décrit dès 1956 : maux de tête, température supérieure à la température corporelle normale ($> 37,2^{\circ}\text{C}$), nausées et vertiges (Bearcroft 1956). Par la suite plusieurs autres signes cliniques se déclinent (Filipe *et al.* 1973 ; Olson *et al.* 1981; Simpson 1964) sous forme d'éruptions cutanées d'arthralgies, de myalgies, de douleurs rétro-orbitaires, de conjonctivite, de détresse digestive, d'anorexie, de vomissements, de diarrhée ou constipation, d'hypotensions, de malaises ou encore de frissons.

Cet état appelé « dengue like », dont les signes cliniques sont très similaires à ceux déclarés lors d'une infection par la DENV, se développe dans 19 % des cas d'infection ; environ 80 % des cas restent asymptomatiques (Duffy *et al.* 2009).

Aujourd'hui, et suite à l'épidémie de 2013 en Polynésie Française, la Pan American Health Organisation (PAHO) définit un cas suspect d'infection ZIKV si un patient présente une éruption cutanée ou une élévation de la température corporelle accompagné d'au moins un des symptômes suivants (non expliqués par d'autres conditions médicales) (PAHO (I) 2015 ; PAHO (II) 2015):

- Arthralgie ou myalgie,
- Conjonctivite non-purulente ou une hyperhémie conjonctivale,
- Des maux de tête ou malaise.

La période d'incubation est de 3 à 10 jours (Lazear *et al.* 2016; Musso *et al.* 2014) et les symptômes persistent de quelques jours à une semaine (CDC ; Duffy *et al.* 2009).

2. Atteintes neurologiques, syndrome de Guillain-Barré

Jusqu'à l'épidémie de 2013 en Polynésie Française, le taux d'hospitalisation dû à une infection par ZIKV était faible et aucune complication sévère n'avait été mise en évidence (Duffy *et al.* 2009; Oehler *et al.* 2014). Ce sont les épidémies suivantes qui ont fait ressortir des formes de pathologies graves avec notamment le syndrome de Guillain-Barré (GBS) pour lequel l'incidence est de 24 pour 100 000 patients infectés soit environ 10 fois plus que le taux basal (Cao-Lormeau *et al.* 2016 ; Dos Santos *et al.* 2016). Cette pathologie est liée à une réponse auto-immune aberrante altérant la gaine de myéline ou les membranes des axones des nerfs périphériques et de leur racine rachidienne influant négativement sur les communications neuronales (Willison *et al.* 2016). De fait, le GBS se traduit par une réduction de l'autonomie qui se manifeste par une faiblesse progressive des membres, une diminution des réflexes, des paralysies faciales plus ou moins prononcées, des myalgies, des paresthésies, des tachycardies ventriculaires, des dysfonctionnements pulmonaires sévères, des dysfonctionnements de la vessie ou des intestins et/ou des hypotensions artérielles (Oehler *et al.* 2014 ; Willison *et al.* 2016). La plupart des améliorations surviennent au cours de la première année mais certains patients pourraient conserver des séquelles et une qualité de vie réduite (Cao-Lormeau *et al.* 2016 ; Willison *et al.* 2016).

3. Autres atteintes chez l'adulte

L'impact du neurotropisme de ZIKV est souligné par sa mise en évidence dans des cas d'encéphalites (Nicastri *et al.* 2016) et de méningo-encéphalites (Carteaux *et al.* 2016). Plus rarement, ZIKV est lié à des cas de thrombocytopénie se caractérisant par une diminution de

la quantité de plaquettes dans le sang induisant des hémorragies. L'incidence de cette atteinte est de 1,4 pour 100 000 patients infectés avec un taux de mortalité de 2 % (Van Dyne *et al.* 2019). Quelques cas d'atteintes oculaires ont également été rapportés avec détection pour 1 cas du génome de ZIKV dans l'humeur aqueuse (Furtado *et al.* 2016). Il s'agit majoritairement d'uvéites caractérisées par une baisse de l'acuité visuelle, une vision floue, un inconfort pour réaliser des travaux qui nécessitent une vision de près, une légère rougeur, un myosis, une augmentation de la pression oculaire et l'impression de flash lumineux. Cependant les patients retrouvent leur acuité visuelle basale après traitement (Fontes 2016 ; Furtado *et al.* 2016 ; Kodati *et al.* 2017; Parke *et al.* 2016).

4. Syndrome congénital

ZIKV a un neurotropisme chez l'adulte dont l'impact est d'autant plus grave chez les fœtus et nourrissons. Ce virus a été associé à des sévères malformations congénitales se manifestant par un volume cérébral anormal, des ventriculomégalies, des microcéphalies, des lésions du système nerveux central, des calcifications cérébrales, des retards de croissance *in utero*, un volume du liquide amniotique, un flux artériel dans le cerveau ou dans l'artère ombilicale anormaux, tous pouvant entraîner le décès *in utero* du fœtus, et chez les nourrissons et les enfants, des malformations oculaires et des convulsions (Brasil *et al.* 2016 ; Marques *et al.* 2019). Une étude rétrospective a décrit 2 vagues de microcéphalie pendant l'épidémie de 2015/2016 au Brésil. La première vague qui a lieu dans le nord du Brésil de septembre 2015 à avril 2016 a eu une incidence mensuelle d'environ 50 cas pour 10 000 nouveaux nés. Celle-ci été suivie par une deuxième vague d'infection dans le reste du pays, de mai 2016 à novembre 2016, avec une incidence de 15 cas pour 10 000 nouveaux nés par mois, alors que l'incidence normale de microcéphalie est de 3,2. Les raisons de ces variations dans le temps et l'espace ne sont pas connues mais l'intensité de l'épidémie, les interventions de santé publique et d'autres potentiels facteurs secondaires pourraient être des explications (de Oliveira *et al.* 2017). L'incidence de microcéphalie associée ou non à une mortalité fœtale varie également en fonction du trimestre de grossesse durant lequel survient l'infection. Cette incidence est plus élevée lorsque l'infection a lieu au cours du premier trimestre (Cauchemez *et al.* 2016; Franca *et al.* 2016). Une étude rétrospective a montré que ces malformations congénitales avaient déjà lieu pendant l'épidémie de Polynésie Française en 2013. En effet, l'incidence du développement de microcéphalie était alors de 95 cas pour 10 000 femmes infectées au cours du premier trimestre de grossesse (contre 42 cas tous trimestres confondus) (Cauchemez *et al.* 2016). Une analyse histopathologique des tissus cérébraux après autopsies

des fœtus et nouveaux nés présentant une microcéphalie a montré, entre autres, des calcifications cérébrales, une dégénérescence des cellules, une prolifération des cellules gliales (tissus de soutiens) et des nécroses. Le génome de ZIKV avait été détecté par RT-PCR dans les tissus cérébraux et des antigènes viraux avaient été retrouvés dans des cellules gliales et des neurones (Martines *et al.* 2016; Mlakar *et al.* 2016).

Ce syndrome congénital est également accompagné d'atteintes oculaires se manifestant par des lésions maculaires diminuant l'acuité visuelle, une hypoplasie du nerf optique, des glaucomes congénitaux, des strabismes et/ou une atrophie chorio-retiniennes entraînant, entre autres, une mauvaise vascularisation de la rétine (Marques *et al.* 2019 ; Yopez *et al.* 2017). Ces lésions, cérébrales et oculaires, peuvent aller jusqu'à la cécité (Ventura *et al.* 2017). D'autres dysfonctionnements neurologiques peuvent apparaître comme des épilepsies, hémiparésies, dyskinésie et/ou dystonie (van der Linden *et al.* 2016).

VI. Traitements et prévention

Aujourd'hui, aucun traitement spécifique, ni vaccin efficace contre ZIKV sont sur le marché. La lutte antivectorielle, la prévention contre les piqûres de moustiques et la transmission par voie sexuelle, le suivi renforcé des femmes enceintes et les traitements symptomatiques sont les seules contre-mesures recommandées par les autorités de santé (Ministère de la santé (I) 2019 ; WHO 2018).

1. Développement de traitements spécifiques

Le but d'un traitement est de réduire la charge virale, de limiter les symptômes et, dans le cas particulier de ZIKV, de protéger le fœtus. Plusieurs études et criblages ont proposé d'élargir l'utilisation de médicaments déjà approuvés, de composés pharmacologiquement actifs contre différents pathogènes et potentiellement ZIKV ou de molécules identifiées comme potentiellement active pharmacologiquement *in silico* mais n'ayant pas encore démontré d'effets *in vitro*. Parmi ces molécules, dont certaines sont déjà connues dans le traitement des infections aux *Flavivirus*, on retrouve :

- Des analogues nucléosidiques qui vont inhiber la polymérase comme la ribavirine, le 7-deaza-2'-C-methyl-D-adenosine (7DMA) (Zmurko *et al.* 2016), le sofosbuvir (Bullard-Feibelman *et al.* 2017) ou encore, la sophoraflavone (Sze *et al.* 2017) ;

- Des inhibiteurs de synthèse des purines comme l'acide mycophénolique (Barrows *et al.* 2016) ou des pyrimidines avec le Brequinar (Adcock *et al.* 2017) ;
- Des inhibiteurs d'action des caspases comme l'Emricasan (Xu *et al.* 2016a) ou du protéasome comme le Bortezomib (Barrows *et al.* 2016) ;
- Des inhibiteurs de l'interaction de la protéine d'enveloppe de ZIKV avec les récepteurs cellulaires comme le ZINC33683341 (Fernando *et al.* 2016) ;
- Des antipaludiques comme la méfloquine (Balasubramanian *et al.* 2017; Barrows *et al.* 2016) ;
- Des perturbateurs de l'endolysosome et de la fusion membranaire comme la niclosamide (Li *et al.* 2017; Xu *et al.* 2016a), la nitazoxanide (Li *et al.* 2017) ou encore la daptomycine (Barrows *et al.* 2016).

Les essais n'ont pour l'instant pas abouti à des autorisations de mise sur le marché pour cause de toxicité, par manque d'efficacité, de schéma thérapeutique difficile à mettre en œuvre chez l'Homme ou des essais *in vitro* ou *in vivo* pas assez avancés.

2. Vaccin

Selon l'OMS, 11 vaccins sont pour le moment en étude. Dix sont en essais cliniques de phase 1 et un en phase 2. On retrouve des vaccins à base d'ADN, de peptides, d'ARN messagers, de virus entiers inactivés ou de vecteurs viraux recombinants. Pour le moment, 4 ont fait l'objet d'une publication (WHO vaccine).

L'essai en phase 1 du vaccin à ADN, GLS-5700, a été mené aux Etats-Unis et au Canada sur 40 personnes. Cet ADN codant pour les protéines d'enveloppe et de pré-membrane de ZIKV a été administré par voie intradermique suivis d'une électroporation à la primo-vaccination, à 1 puis 3 mois. Des réactions locales au site de vaccination ont été rapportées dans 50 % des cas mais aucun effet indésirable grave n'a été observé. Les tests *in-vitro* réalisés avec les sérums des participants 2 semaines après la dernière vaccination ont permis de mettre en évidence l'apparition d'anticorps neutralisants dans 62 % des cas. Enfin l'injection intrapéritonéale des sérums de participants a permis de protéger 92 % des souris d'un challenge léthal (Tebas *et al.* 2017; WHO vaccine). Une autre étude en phase 1 sur ce vaccin est actuellement menée à Porto-Rico sur une cohorte plus importante comprenant 160 participants. Les résultats ne sont, toutefois, pas encore disponibles (WHO vaccine).

Deux autres vaccins à ADN ont été testés en phase 1. Les deux vaccins induisent l'expression des protéines d'enveloppe et de pré-membrane de ZIKV, sauvage ou sous forme d'une chimère avec le virus de l'encéphalite japonaise. Différents schémas de vaccination ont été étudiés pour les 2 vaccins. Ils sont tous deux bien tolérés et immunogènes mais, une meilleure réponse est observée pour le vaccin contenant l'ADN non chimérique (souche ZIKV sauvage) administré en doses fractionnées avec un dispositif sans aiguille (PharmaJet) à 4 et 8 semaines après la primo-vaccination. Tous les participants ont développé une réponse immunitaire humorale, des anticorps neutralisants et une très bonne réponse immunitaire cellulaire avec les lymphocytes T (LT) CD4 et CD8. Ce vaccin a donc été retenu pour un essai clinique en phase 2 sur des populations de régions endémiques d'Amérique du Sud et centrale, des Caraïbes et des Etats-Unis afin de vérifier son innocuité, son immunogénicité et son efficacité (Gaudinski *et al.* 2018; WHO vaccine).

Un autre vaccin basé sur ZIKV inactivé au formol est en développement clinique aux Etats-Unis en essai de phase 1. Il est injecté en intramusculaire avec rappel à 1 mois. Des résultats préliminaires obtenus avec 67 participants ont permis d'observer une bonne tolérance et une innocuité du vaccin. L'immunogénicité est suffisante pour présenter un bénéfice clinique cependant la mémoire immunitaire mise en jeu semble décroître 1 mois après le dernier rappel. Un autre essai de phase 1 en cours à Porto-Rico permettra d'évaluer son innocuité et son immunogénicité sur une population présentant une forte immunité naturelle aux *Flavivirus*. Celui-ci pourrait présenter un effet stimulant sur la réponse immunitaire et la mémoire immunitaire.

Des données plus tardives permettront d'évaluer l'innocuité à long-terme, de mieux caractériser la réponse immunitaire et la durabilité de la mémoire immunitaire mais aussi d'affiner la dose optimale, le schéma et la population pour la vaccination (Modjarrad *et al.* 2018; WHO vaccine).

Un vaccin basé sur l'injection d'un ARN messager (ARNm) codant pour les protéines d'enveloppe et de pré-membrane encapsulé dans une nanoparticule lipidique a montré chez la souris la production d'un très bon titre d'anticorps neutralisants, une diminution de l'induction d'anticorps responsable d'ADE et une protection face à un challenge ZIKV marqué par une immunité stérilisante et une protection fœtale. Ce vaccin est actuellement en essai clinique de phase 1 (Richner *et al.* 2017a; Richner *et al.* 2017b ; WHO vaccine).

De nombreux autres vaccins sont à des stades précliniques plus ou moins avancés et présentent des résultats prometteurs. On retrouve des vaccins à ARNm encapsulé dans une nanoparticule lipidique (Pardi *et al.* 2017), à ADN (Abbink *et al.* 2017; Larocca *et al.* 2016), des adénovirus recombinants (Abbink *et al.* 2016 ; Abbink *et al.* 2017), codants pour les protéines d'enveloppe et de pré-membrane, des Virus-Like Particules (VLP) exprimant les protéines de structures (C, E et PrM) (Boigard *et al.* 2017 ; Garg *et al.* 2017 ; Salvo *et al.* 2018). Un vaccin basé sur le domaine III de la protéine d'enveloppe de ZIKV a également été développé. Il induit chez la souris une réponse immunitaire humorale n'induisant pas d'ADE et avec un titre d'anticorps neutralisant habituellement protecteur dans les autres essais recensés mais pour lequel la protection face à un challenge n'a pas été testée (Yang *et al.* 2017).

VII. Cinétique de l'infection par le virus Zika

1. Cinétique virale

Lors de l'infection par ZIKV, l'ARN viral est détectable dans plusieurs fluides du corps humains :

- Dans le plasma pendant les 4 jours suivant l'apparition des symptômes, avec un pic virémique concomitant avec l'apparition des symptômes. Dans un peu plus de 30% des cas la virémie s'étend de 5 à 8 jours après l'apparition des symptômes, la clairance dans le plasma étant estimée à 11,5 jours. La charge virale est toutefois assez faible, de 300 à 500 copies d'ARN/ml (Barzon *et al.* 2018). Cette virémie persiste plus longtemps dans le sang total (Barzon *et al.* 2018; Lustig *et al.* 2016 ; Mansuy *et al.* 2017). Cependant, l'ARN viral est détectable dans le plasma dans environ 50% des cas (Barzon *et al.* 2018; Bingham *et al.* 2016). Dans une autre étude réalisée sur une plus grande population de patients à Porto-Rico, l'ARN viral était détectable dans 88% des cas avec une clairance dans le plasma 15 jours après l'apparition des symptômes (Paz-Bailey *et al.* 2018).
- Dans l'urine jusqu'à 11 à 24 jours après l'apparition des symptômes (Barzon *et al.* 2018 ; Paz-Bailey *et al.* 2018). La virurie est plus longue que la virémie. Le pic de virurie a lieu aux alentours d'une semaine après l'apparition des symptômes et la charge virale est plus forte allant de 580 à $1,7 \times 10^6$ copies/ml avec une médiane de 4×10^4 copies /ml (Barzon *et al.* 2018). L'ARN viral est détectable dans l'urine pour

59% à 90% des personnes (Barzon *et al.* 2018 ; Bingham *et al.* 2016 ; Paz-Bailey *et al.* 2018).

- Dans la salive jusqu'à 14 jours après l'apparition des symptômes. Le pic d'excrétion virale a lieu aux alentours d'une semaine après l'apparition des symptômes avec une charge virale allant de 1×10^3 à 6×10^6 copies/ml avec une médiane de 6×10^4 copies /ml (Barzon *et al.* 2018). L'ARN viral est détectable dans la salive dans 4% (Paz-Bailey *et al.* 2018) à environ 80% des cas (Bingham *et al.* 2016).
- Dans le sperme jusqu'à 25 à 42 jours après l'apparition des symptômes (Barzon *et al.* 2018 ; Paz-Bailey *et al.* 2018). Cependant, l'ARN viral est détectable dans le sperme que dans environ 50% des cas (Barzon *et al.* 2018 ; Paz-Bailey *et al.* 2018).

Les différences peuvent être expliquées par la variation de sensibilité de détection de la RT-PCR en temps réel employée et les différences de populations étudiées dans les trois études ; Paz-Bailey *et al.* étudient une population constituée de résidents de Porto-Rico présentant une exposition passée aux *Flavivirus* plus fréquente que les voyageurs naïfs aux *Flavivirus* constituant les populations des études de Bingham *et al.* et Barzon *et al.* (Barzon *et al.* 2018 ; Bingham *et al.* 2016 ; Paz-Bailey *et al.* 2018).

2. Cinétique de la réponse immunitaire

a. Réponse immunitaire – Préambule

Le système immunitaire assure l'intégrité biologique de l'organisme en reconnaissant et éliminant le non-soi ou le soi dit altéré mais aussi en reconnaissant et tolérant le soi et le non-soi dit inoffensif. Pour cela, les défenses de l'hôte disposent de plusieurs systèmes de reconnaissance et d'une multitude de mécanismes effecteurs. Plusieurs références m'ont permis d'écrire ce préambule (Aymeric J.-L. *et al.* 2009 ; Janeway Charles A. *et al.* 2003 ; Simon M. 2009).

Deux types d'immunités sont à distinguer : (i) l'immunité innée ou naturelle qui constitue la première ligne de défense de l'organisme et comprend les barrières anatomiques, physiologiques, phagocytaire et inflammatoire, (ii) l'immunité adaptative ou spécifique caractérisée par la reconnaissance spécifique d'antigènes et la création d'une mémoire immunitaire permettant de lutter plus efficacement et rapidement lors d'une rencontre *de novo* avec le même antigène. Les cellules de l'immunité innée sont présentes au sein des différents tissus de l'organisme alors que celles de l'immunité adaptative, localisées dans les tissus et

organes lymphoïdes, migrent aux sites d'infection. Lors d'une réponse immunitaire, une collaboration et une synergie entre les deux types d'immunité vont se mettre en place. Il est également possible de distinguer deux composantes dans l'immunité adaptative : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale, mettant en œuvre notamment les anticorps dit immunoglobulines.

a. Activation des lymphocytes T

Au site d'infection, l'adhésion du pathogène aux cellules dendritiques se fait via les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), motifs moléculaires très conservés parmi les différents agents pathogènes, et les PRR (Pathogen Recognition Receptor), leurs récepteurs spécifiques solubles et cellulaires. L'engagement des PRR par leurs ligands entraîne des réponses cellulaires variées dépendant du type de PRR engagé et des PAMP. Dans le cas d'un pathogène, leur activation conduit à la maturation de la cellule dendritique, l'expression de nombreux gènes entraînant la synthèse de médiateurs et de molécules de co-activation des lymphocytes T, la mobilité cellulaire vers les tissus lymphoïdes secondaires et l'internalisation par phagocytose du pathogène puis la digestion de ces protéines au sein du phagolysosome. Les peptides issus de la digestion du pathogène sont alors associés aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) humain de classe I ou II, puis exposés à la membrane des cellules dendritiques. Ces dernières mûrissent puis migrent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) où la réponse immunitaire adaptative est initiée par présentation des antigènes aux lymphocytes T. L'interaction entre la cellule dendritique, cellule présentatrice d'antigène, et le lymphocyte T s'effectue dans un premier temps par des molécules d'adhésion mais l'activation de ce dernier nécessite l'engagement de 3 signaux :

- La liaison du CMH-peptide antigénique au récepteur T (T-Receptor, TR) qui viennent renforcer l'interaction d'adhésion ;
- L'engagement d'un corécepteur CD4 ou CD8 (marqueur du lymphocyte T CD4+, lymphocyte T régulateur ou lymphocyte T auxiliaire = lymphocyte T helper, et du lymphocyte T CD8+, cytotoxique) au CMH-II ou CMH-I, respectivement, vient stabiliser la liaison durablement ;
- La liaison des molécules de co-activation de la cellule présentatrice d'antigène avec le lymphocyte T induit l'activation de ce dernier. Sans cette stimulation il devient anergique (n'entame pas de réponse immunitaire, y compris lors des prochaines

rencontres avec l'antigène) ou se différencie en lymphocyte T régulateur pour inhiber les réponses immunitaires.

Pendant cette synapse immunologique, qui dure une douzaine d'heure, les deux cellules vont se stimuler réciproquement entraînant la synthèse de différentes cytokines et des récepteurs spécifiques de stimulation et de différenciation. Bien que la plupart des lymphocytes T CD4+, lymphocytes T helper (LTh), ne se différencient pas à cette étape, on les qualifie alors de Th0, certains vont se différencier en :

- Th1, sous l'action de l'Interleukine 2 (IL-2), et vont favoriser une réponse immunitaire cellulaire ;
- Th2, sous l'action de l'IL-4, et vont favoriser une réponse immunitaire humorale ;
- Th17, sous l'action synergique de l'IL-6 et du TGF- β , et vont entretenir l'inflammation.

A l'issue, le lymphocyte T se sépare de la cellule présentatrice d'antigène et, sous l'action des cytokines, entame sa prolifération clonale, amplifiant le nombre de lymphocytes T spécifiques de l'antigène. Ces Th vont ensuite synthétiser différents médiateurs spécifiques orientant l'activation et la différenciation des autres cellules pour générer une réponse immunitaire en accord avec le danger. Ainsi :

- Les Th1 vont intervenir principalement contre des pathogènes intracellulaires, dont les virus. En produisant de l'IFN- γ ils permettent la différenciation des lymphocytes T CD8+ en lymphocytes T cytotoxiques, l'accroissement de leur capacité cytotoxique ainsi que celle des lymphocytes Natural Killer (NK), l'activation des macrophages, la synthèse d'IgG par les plasmocytes qui permettront par la suite l'activation du complément et la mise en place de la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC).
- Les Th2 interviennent contre des pathogènes pluricellulaires. Ils activent les mastocytes, basophiles, éosinophiles, la prolifération clonale des lymphocytes B et la synthèse d'IgE. Les pathogènes recouverts de ces immunoglobulines, sont ensuite ciblés par les cellules activées qui libèrent leurs médiateurs.
- Les Th17 sont particulièrement impliqués dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires. Ils recrutent les neutrophiles et monocytes.

Les lymphocytes T peuvent alors quitter les organes lymphoïdes secondaires et rejoindre les sites d'infection pour participer à la réponse immunitaire. On y trouvera également les Th0 qui pourront subir une différenciation en fonction des cytokines produites.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'immunité adaptative humorale et plus particulièrement aux anticorps produits par les lymphocytes B.

b. Les immunoglobulines ou anticorps

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines constituées de 2 chaînes lourdes H (Heavy) et de 2 chaînes légères L (Light), reliées entre elles de manière covalente par des ponts disulfures inter H et inter H-L.

Les chaînes L sont constituées de 2 domaines, un domaine variable en N-terminal (VL, Variable domain from Light chain) et un domaine constant en C-terminal (CL, Constant domain from Light chain). On retrouve 2 types de chaînes légères, les chaînes Kappa (κ) et Lambda (λ).

Les chaînes H sont quant à elles composées de 4 à 5 domaines, 1 domaine variable en N-terminal (VH, Variable domain from Heavy chain) et de 3 (IgG, A et D) à 4 (IgM et E) domaines constants en C-terminal (CH, Constant domain from Heavy chain). On retrouve chez les IgD, IgG et IgA une région charnière qui sépare les domaines constants 1 et 2 (Figure 7).

Les domaines VL et VH sont chacun composés de 3 régions hypervariables HV 1 à 3. Ce sont les sites de liaison spécifiques à l'antigène et ils constituent le paratope.

Les régions constantes des chaînes H définissent les 5 isotypes des immunoglobulines : IgM (chaîne μ), IgD (chaîne δ), IgG (chaîne γ), IgE (chaîne ϵ) et IgA (chaîne α) ; les classes G et A étant elles-mêmes subdivisées en 4 (IgG1 à IgG4) et 2 (IgA1 et IgA2) sous classes.

Les différents isotypes présentent des organisations moléculaires et des propriétés spécifiques :

- Les IgM sont monomériques lorsqu'elles sont membranaires et pentamériques lorsqu'elles sont sériques. Ce sont les premiers anticorps circulants lors de primo-infection. Elles sont capables de neutraliser, d'agglutiner les antigènes et d'activer le complément mais ne peuvent pas passer la barrière placentaire.

- Les IgD sont des monomères membranaires. Elles participent à l'activation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes et cellules mémoires.
- Les IgG sont des monomères sériques. Ce sont les immunoglobulines sériques les plus abondantes. Elles interviennent dans l'activation du complément, dans la fixation via le Fc (Fragment crystallizable) aux phagocytes, NK et lymphocytes B et sont capables de passer la barrière placentaire.
- Les IgE sont sériques et monomériques. Elles interviennent dans les mécanismes allergiques en se fixant via leur Fc aux mastocytes, basophiles, cellules dendritiques, macrophages et éosinophiles et en entraînant la dégranulation des basophiles et mastocytes.
- Les IgA sont dimériques et sont retrouvées au niveau des muqueuses. Elles empêchent la fixation des agents pathogènes à la surface des cellules épithéliales.

Un changement d'isotype est possible au cours de la réponse immunitaire adaptative humorale, on l'appelle la commutation de classe ou commutation isotypique.

La digestion enzymatique des immunoglobulines a permis de séparer leurs fragments Fab (antigen binding) de leur fragment Fc et ainsi de caractériser leurs fonctions et leur structure (Figure 7).

Les Fab sont constitués des régions variables de la chaîne H et de la chaîne L et forment ensemble le paratope qui reconnaît de manière spécifique l'épitope. L'épitope est un motif de l'antigène caractérisé par une surface restreinte composée de résidus d'acides aminés définis. Il est le déterminant de la spécificité antigénique ; le changement d'un seul résidu par mutation ou par modification post-traductionnelle peut être suffisant pour altérer sa reconnaissance. On distingue 4 types d'épitopes : les épitopes linéaires (plusieurs acides aminés reconnus présents sur une séquence peptidique continue), les épitopes conformationnels (acides aminés reconnus très éloignés sur la séquence mais proches dans l'espace grâce aux repliements des protéines), des épitopes quaternaires (acides aminés localisés sur la jonction de deux protéines en interaction) (Collins *et al.* 2019) et les épitopes cryptiques (non-accessibles dans la configuration native des protéines mais exposés lors d'une dénaturation ou de l'expression partielle de l'antigène).

Le Fc est quant à lui impliqué dans diverses propriétés effectrices des anticorps :

- La neutralisation d'antigène, les empêchant par gêne stérique d'atteindre leur cible cellulaire ;
- L'activation du complément,
- L'opsonisation pour favoriser la phagocytose,
- L'ADCC,
- Le passage transplacentaire des IgG maternelles vers le fœtus,
- La traversée des épithéliums des muqueuses et des glandes exocrines.

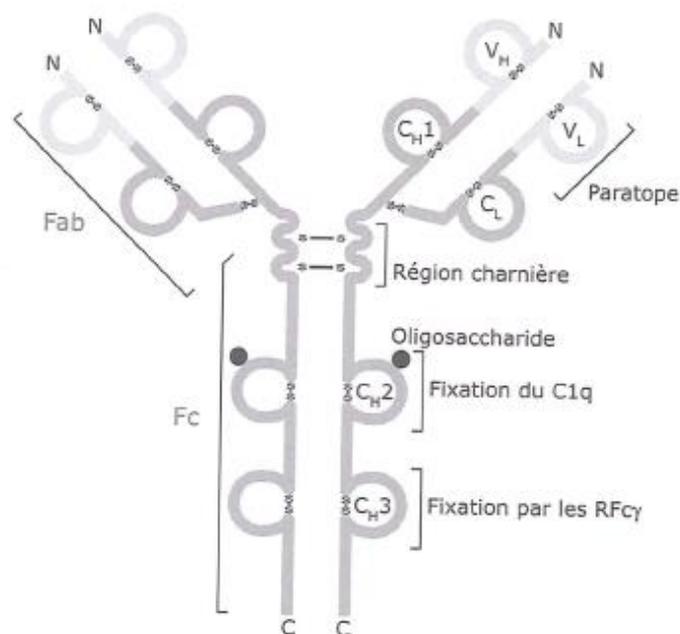


Figure 7. Représentation schématique d'une immunoglobuline humaine. VH ou CH, domaine variable ou constant de la chaîne lourde, VL ou CL, domaine variable ou constant de la chaîne légère (Aymeric J.-L. *et al.* 2009).

c. Activation des lymphocytes B

Les lymphocytes B naïfs expriment à leur membrane des immunoglobulines de classe M et D qui constituent, avec leur corécepteur, le B-cell Receptor (BCR). Lors d'une infection, les antigènes ainsi que les cellules dendritiques vont circuler dans la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques. Le lymphocyte B va reconnaître des antigènes à l'état natif à la surface du pathogène. Son activation nécessite alors l'engagement d'au moins deux BCR, ce qui est possible par la présence de nombreux épitopes à la surface des antigènes. Cette interaction augmente l'expression des molécules du CMH-II, des molécules de co-activation des lymphocytes T, l'expression de récepteurs aux cytokines synthétisées par les LTh et la

phagocytose de l'antigène. Le lymphocyte B se comporte alors comme une cellule présentatrice d'antigène et présente les peptides sur le CMH-II aux LTh. S'en suit la formation d'une synapse immunologique conduisant à l'activation du lymphocyte B. Sa liaison avec le LTh ainsi que la présence des interleukines de prolifération entraînent son expansion clonale et pour certains d'entre eux, une différenciation en plasmocyte sécréteur d'IgM de basse affinité pour l'antigène. Les autres lymphocytes B continuent de se multiplier intensément et acquièrent des mutations au sein des parties variables des immunoglobulines optimisant leur affinité pour leurs antigènes, on parle alors d'hypermutation somatique. A l'issue, les lymphocytes B présentant une forte affinité pour l'antigène présenté à la surface des cellules dendritiques folliculaire (cellule présentatrice d'antigène des organes lymphoïdes) vont recevoir un signal de survie ; les autres rentreront en apoptose. Les cellules sélectionnées positivement vont recevoir de nouveau des signaux des LTh permettant ainsi la différenciation en :

- Plasmocytes produisant des IgM de haute affinité pour l'Ag et capable de produire des immunoglobulines d'autres classes (IgA, IgE ou IgG) après stimulation de différentes interleukines entraînant la commutation de classe.
- Lymphocytes B mémoires.

Il existe également en plus faible proportion des lymphocytes B, dit LB-1, qui sont antigènes thymo-indépendants ; leur activation est indépendante des lymphocytes T. Certains antigènes comme les endotoxines (lipopolysaccharide), les flagelles, certains polypeptides, des polysaccharides, *etc...* vont être fixés par plusieurs BCR à la surface d'un lymphocyte B et vont l'activer. Cette réponse immunitaire se déroule principalement dans la rate et au niveau des muqueuses ; elle est faible, n'entraîne la production que des IgM et IgA et n'induit pas l'activation de lymphocyte B mémoire.

d. Mémoire immunitaire

La réponse immunitaire adaptative est caractérisée par la mise en place de la mémoire immunitaire et concerne tous les lymphocytes T ainsi que les lymphocytes B. Pour la majeure partie, les lymphocytes T mémoire proviennent de lymphocytes T activés ne recevant plus de stimulation antigénique. On distingue les lymphocytes T de la mémoire centrale (T_{CM}) qui reste dans les tissus lymphoïdes et les ceux de la mémoire effectrice (T_{EM}) qui se situent dans les tissus périphériques. En absence de stimulation antigénique les T_{EM} vont évoluer lentement en T_{CM} .

Les plasmocytes ne sont plus capables de se multiplier. Certains vont migrer dans des niches de la moelle osseuse où ils recevront des signaux de survie et produiront pendant très longtemps des immunoglobulines de haute affinité pour maintenir une immunité. Les lymphocytes B mémoire vont quant à eux quitter les organes lymphoïdes secondaires pour la circulation sanguine et seront capables d'être rapidement sollicités en cas de seconde infection. Ils continuent à se diviser très lentement pour maintenir l'ensemble des lymphocytes B mémoire et de plasmocytes.

Cette mémoire immunitaire est importante car elle permet une réponse immunitaire très rapide et très puissante. En effet, après la détection d'un antigène déjà rencontré sur les cellules présentatrices d'antigène, les T_{EM} des tissus vont pouvoir exercer leurs fonctions effectrices immédiatement et intensément en présence de l'environnement cytokinique inflammatoire. De plus, les T_{CM} et lymphocyte B vont être capables de s'activer à partir d'une concentration d'antigène beaucoup plus faible, de proliférer plus rapidement, générer des récepteurs à l'antigène et des anticorps de meilleures affinités, en plus grosse quantité et directement. Ces propos sont illustrés par la figure 8, la réponse immunitaire secondaire face à l'antigène (à droite) se met en place avec une latence quasi-inexistante et une intensité de réponse en anticorps 10 à 100 fois supérieure à celle de la première rencontre (Figure 8).

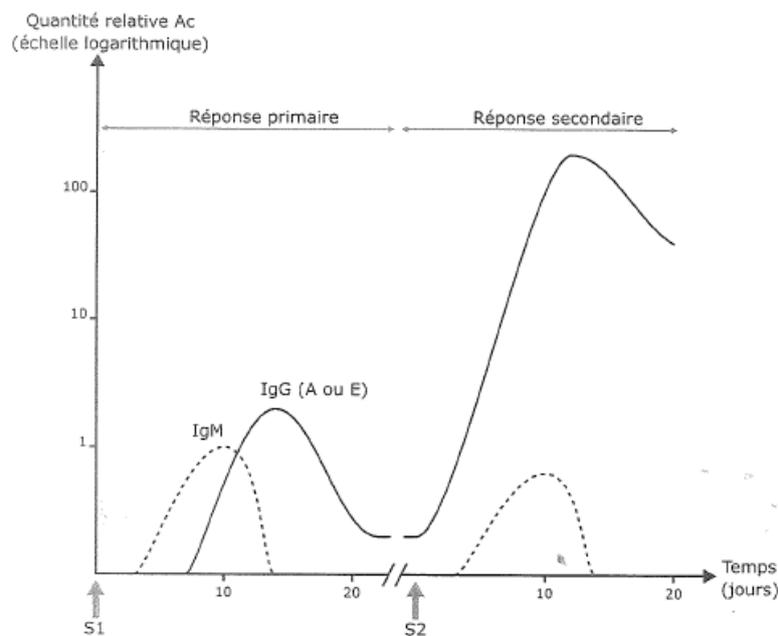


Figure 8. Représentation schématique de la cinétique de la réponse immunitaire humorale. S1, stimulation antigénique primaire. S2, stimulation antigénique secondaire (Aymeric J.-L. *et al.* 2009).

b. Réponse immunitaire dans le cas d'infections par des *Flavivirus*

Lors d'une infection par ZIKV, les IgM apparaissent 5 à 14 jours après l'apparition des symptômes pour atteindre un maximum entre 15 et 30 jours après l'apparition des symptômes. Environ 1 à 2 mois après l'apparition des symptômes la quantité d'IgM diminue de moitié puis disparaît entre 3 et 4 mois après l'apparition des symptômes (Matheus *et al.* 2019; Pasquier *et al.* 2018). Les IgG sont quant à eux détectables 1 à 14 jours après l'apparition des symptômes pour atteindre un maximum entre 15 et 30 jours après l'apparition des symptômes. Leur quantité reste stable pendant 6 à 10 mois (Matheus *et al.* 2019; Pasquier *et al.* 2018).

D'autres études proposent l'existence de deux types de profils de réponse immunitaire lors d'une infection par un *Flavivirus* :

- Les patients n'ayant jamais été infectés par un *Flavivirus* développent un profil de réponse immunitaire de primo-infection où les IgM spécifiques à ZIKV apparaissent entre 5 et 15 jours (médiane de 8 jours) après l'apparition des symptômes. Les IgG arrivent entre 12 et 26 jours (médiane de 17 jours) après les symptômes (Figure 9A). Ce profil étant observable chez les voyageurs.
- Les patients présentant une cicatrice immunitaire due à une infection primaire par un *Flavivirus* vont développer un profil de réponse immunitaire de seconde infection : ils ne développeront pas ou peu d'IgM spécifiques de ZIKV mais ils produiront très rapidement un fort taux d'IgG dirigés contre ZIKV (Figure 9B). Ce profil étant plus retrouvé chez les patients vivants en zones de co-circulation flavivirales (Barzon *et al.* 2018 ; Ohst *et al.* 2018; Steinhagen *et al.* 2016).

Les patients vaccinés contre le virus de la fièvre jaune présentent un profil sérologique similaire aux patients naïf n'ayant jamais rencontré de *Flavivirus* (Barzon *et al.* 2018).

Ces études ont été menées dans le cadre de comparaison d'outils de diagnostic. Les tests utilisés étant basés sur la détection de la protéine NS1, ils ne représentent pas la cinétique de la totalité des anticorps.

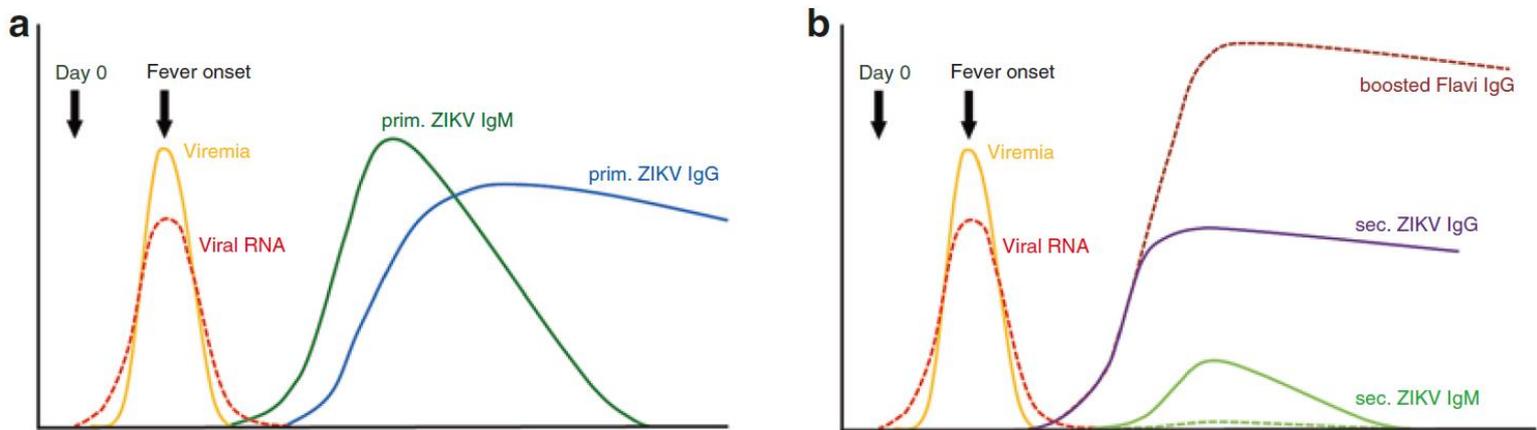


Figure 9. Représentation schématique de la cinétique virale et de la réponse immunitaire humorale **a.** chez les patients naïfs vis-à-vis des *Flavivirus* et **b.** chez les patients ayant déjà eu une infection flavivirale. En abscisse, temps post-infection et en ordonnée, titre viral, d'ARN viral ou en anticorps IgM et IgG (Ohst *et al.* 2018).

VIII. Diagnostic des infections ZIKV

L'une des nombreuses missions du Centre National de Référence des arbovirus est de diagnostiquer une infection par ZIKV à partir d'échantillons de patients. Les échantillons suspectés ou confirmés comme étant infectés avec ZIKV doivent être manipulés en laboratoire de confinement de biosécurité de niveau 2 (Niveau de Sécurité Biologique 2, NSB2). En France, une infection ZIKV est une maladie à déclaration obligatoire.

Face à une éventuelle infection à ZIKV, l'OMS recommande :

- La détection du génome viral à partir du sang total, du sérum ou de l'urine recueillis chez des patients présentant des symptômes apparents depuis un nombre de jours inférieur ou égal à 7.

Une attention particulière doit être portée à l'interprétation des résultats négatifs, face à une virémie chutant très rapidement après l'apparition des symptômes le test peut manquer de sensibilité de détection.

- La détection des IgM à partir du sang total ou des sérums collectés chez des patients présentant des symptômes apparents depuis plus de 7 jours.

Les technologies mises en œuvre pour réaliser les tests sérologiques recommandés incluent la neutralisation virale par les anticorps (tests les plus spécifiques), les immuno-essais enzymatiques (ELISA) et les tests à immunofluorescence (IFA). Les ELISA peuvent être réalisés sur des lysats viraux, des surnageants de culture virale ou des protéines recombinantes (WHO (III) 2016). En sérologie, une séroconversion, la présence d'IgM dirigés contre ZIKV uniquement ou un titre en anticorps neutralisant 4 fois supérieur à celui des autres *Flavivirus* suggèrent une exposition récente à ZIKV (Ministère de la santé (II)).

Enfin, dans la mesure du possible l'OMS recommande de prélever un échantillon dans les 5 premiers jours de la maladie, d'effectuer un second prélèvement à au moins 2 à 3 semaines d'intervalle et également de collecter d'autres types d'échantillons (liquide céphalorachidien ou amniotique, sperme et salive) permettant de confirmer le diagnostic ou de rechercher son association aux complications neurologiques, microcéphalies ou transmission par voie sexuelle (WHO (III) 2016).

Face à la présence d'anticorps présentant une réaction croisée et d'une fenêtre de virémie post-symptômes très courte limitant le diagnostic, le développement de sérodiagnostic très sensible et spécifique est nécessaire. La déclaration de l'OMS, plaçant en février 2016 l'épidémie ZIKV comme urgence de santé publique mondiale, a accéléré le développement des diagnostics *in vitro* de ZIKV. Ainsi, l'agence américaine de l'alimentation et des médicaments (U.S. Food and Drug Administration, FDA) a mis en place le processus d'autorisation d'utilisation d'urgence (Emergency Use Authorization, EUA). Ce processus permet de contourner temporairement les procédures classiques d'évaluation des outils de diagnostic pendant une épidémie et ainsi d'obtenir une autorisation d'utilisation temporaire en quelques semaines voire quelques jours. Lorsque cette épidémie est officiellement terminée ces outils de diagnostic sont alors reclassifiés en « test développé en laboratoire » (Laboratory-developed test) et doivent être soumis aux procédures réglementaires d'autorisation de mise sur le marché. Ainsi, on retrouve sur le site de la FDA un total de 13 diagnostics moléculaires sous EUA de réactions en chaînes par polymérase (Polymerase Chain-reaction, PCR) et 5 diagnostics sérologiques dont 3 approuvés selon les procédures réglementaires par la FDA (Kurani *et al.* 2018).

En Europe, selon le rapport annuel de 2016 de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM), 5 techniques d'amplification génomique par PCR et 3 techniques de détection d'anticorps par des méthodes immunoenzymatiques

(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) présentaient la Certification Européenne (CE) fin 2016, permettant ainsi leur emploi dans les pays membres de l'Union Europe pour le diagnostic ZIKV (ANSM 2016).

1. Diagnostic moléculaire

Aucun diagnostic moléculaire n'est recommandé ni par l'OMS, ni par le CDC, ni par la Haute Autorité de Santé (HAS) française. L'identification de ZIKV se fait dans la majeure partie des cas par une technique d'amplification par RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR) mais la technique d'amplification médiée par la transcription (Transcription Mediated Amplification, TMA) est également utilisée. Cette dernière est plus économique que la PCR puisqu'il s'agit d'une technique qui se fait à température ambiante. Les sondes s'hybrident à l'ARN qui est alors reverse-transcrit en ADNc puis l'ARN polymérase transcrit l'ADNc en ARN qui repartent ensuite dans la boucle d'amplification. Ces techniques de diagnostic ciblent les gènes E, PrM, M, NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5 ou la région 3'UTR (Faye *et al.* 2013; FDA ; Lanciotti *et al.* 2008).

Une technique d'immunochromatographie sur bandelette permet la détection de la protéine NS1 virale sécrétée dans le sérum avec une sensibilité de 81,0% et une spécificité de 86,0%. Cette technique n'est pour le moment pas commercialisée (Bosch *et al.* 2017).

2. Diagnostic sérologique

La fenêtre de virémie post-symptômes très courte limite la détection du génome viral après 7 jours post-infection nécessitant une détection indirecte de l'infection par la détection d'anticorps induits par ZIKV en utilisant des outils de diagnostic sérologique. La fiabilité de ces outils est évaluée selon leur spécificité, qui représente sa capacité à ne pas détecter des échantillons négatifs, elle est calculée avec les échantillons du groupe non-positif à ZIKV ; Et leur sensibilité, qui représente sa capacité à détecter des anticorps induits contre le virus infectant, est calculée avec les échantillons du groupe positif à ZIKV. Ces deux paramètres peuvent être variables selon la cohorte utilisée, leur évaluation est donc difficile

Dans l'union européenne plusieurs tests portent le marquage CE. On retrouve les tests ELISA développés et commercialisés par Euroimmun basés sur la reconnaissance de la protéine recombinante NS1 de ZIKV par les anticorps IgM, IgA et IgG dans le plasma ou le sérum des patients. Une infection récente à ZIKV semblerait être caractérisée par la présence d'IgM et une faible avidité des IgA et IgG. Ces derniers seraient alors des marqueurs

biologiques plus représentatifs du milieu de la phase aiguë et de la phase aiguë tardive, tandis que les IgA, seraient plus représentatifs du début et du milieu de la phase aiguë. La détection de ces derniers signerait alors une infection ZIKV aiguë chez les patients possédant une cicatrice immunologique flavivirale et pouvant, de fait, être IgM-ZIKV négatif. Cette avidité, caractérisable avec le test Euroimmun, combinée à la date du début des symptômes et de la collecte de l'échantillon permet donc d'interpréter les résultats et de poser un diagnostic (Amaro *et al.* 2019 ; Warnecke *et al.* 2019). Ces tests ELISA ont largement été étudiés et leurs paramètres de performance, sensibilité et spécificité, ont été déterminés. On observe ainsi une grande variabilité en fonction des cohortes (Table 1). La sensibilité de détection des

IgM varie entre 35,7% et 90,9% et leur spécificité entre 90,0% et 99,7%. La sensibilité de détection des IgG varie de 58,3% à 100% pour une spécificité de 70,0% à 100,0%. La sensibilité et la spécificité de détection des IgA sont 93,5% et 95,0% respectivement (Granger *et al.* 2017 ; Huzly *et al.* 2016 ; Kadkhoda *et al.* 2017 ; Matheus *et al.* 2019 ; Pasquier *et al.* 2018 ; Safronetz *et al.* 2017 ; Steinhagen *et al.* 2016 ; Warnecke *et al.* 2019). Lorsque l'on combine la détection des IgM à la détection des IgA, la sensibilité peut atteindre 100,0% et la spécificité, plus de 97,0% (Warnecke *et al.* 2019).

Table 1. Sensibilité et spécificité des tests ELISA Euroimmun répertorié dans la littérature.

Référence	1	2	3	4	5	6	7	8	
IgM	Sensibilité	90,9%	35,7%	53,8%	37,5%	36,7%	60,0%	48,4%	49,0%
	Spécificité	97,5%	99,7%	98,7%	98,5%	90,0%	-	97,1%	99,0%
IgA	Sensibilité						93,5%		
	Spécificité						95,0%		
IgG	Sensibilité	58,3%	79,5%			66,7%	100,0%	100,0%	71,0%
	Spécificité	100,0%	99,8%			90,0%	-	-	70,0%

(1) Huzly *et al.* : Taille de l'échantillon : IgM : 12 positifs à ZIKV / 114 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV ou négatifs ; IgG : 11 positifs à ZIKV / 121 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV ou négatifs. (Huzly *et al.* 2016) (2) Steinhagen *et al.* : Taille de l'échantillon : 112 positifs à ZIKV / 252 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV / 1015 négatifs. (Steinhagen *et al.* 2016) (3) Kadkhoda *et al.* : Taille de l'échantillon : 13 positifs à ZIKV / 153 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV ou négatifs. (Kadkhoda *et al.* 2017) (4) Granger *et al.* : Taille de l'échantillon : 29 positifs à ZIKV / 25 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV ou négatifs. (Granger *et al.* 2017) (5) Safronetz *et al.* : Taille de l'échantillon : 30 positifs à ZIKV / 10

Flavivirus autre que ZIKV positifs. (Safronetz *et al.* 2017) (6) Pasquier *et al.* : Taille de l'échantillon : 15 positifs à ZIKV. (Pasquier *et al.* 2018) (7) Warnecke *et al.* : Taille de l'échantillon : 31 positifs à ZIKV / 139 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV. (Warnecke *et al.* 2019) (8) Matheus *et al.* : Taille de l'échantillon : 90 positifs à ZIKV / 64 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV / 45 négatifs. (Matheus *et al.* 2019)

Un autre laboratoire, Dia.Pro., a développé et commercialisé un ELISA permettant la détection des IgM et des IgG dirigés contre la protéine NS1 dans le plasma et le sérum des patients. Une étude montre une sensibilité de 100,0% pour l'ELISA permettant la détection d'IgM et d'IgG avec 15 échantillons positifs à ZIKV (Pasquier *et al.* 2018) tandis qu'avec une cohorte différente comprenant 90 positifs à ZIKV, 64 *Flavivirus* positifs autre que ZIKV et 45 négatifs, la sensibilité est de 69,0% et 79,0% et la spécificité de 96,0% et 62,0% pour les ELISA permettant la détection des IgM et des IgG respectivement (Matheus *et al.* 2019).

Outre-Atlantique, cinq diagnostics sont référencés sur le site de la FDA, 3 ont été approuvés et 2 sont encore sous EUA. Parmi les 3 tests approuvés on retrouve le ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA développé et commercialisé par InBios. Ce kit est basé sur la détection des IgM dirigés contre la protéine E à partir du sérum des patients. Le fabricant annonce une sensibilité supérieure à 90% et une spécificité supérieure à 96%.

Le deuxième test approuvé par la FDA a été développé et est commercialisé par Siemens Healthcare Diagnostics Inc.. ADVIA Centaur Zika test détecte les IgM dirigé contre la NS1, produite sous forme de protéine recombinante, à partir de plasma et de sérums de patients. Il s'agit cette fois ci d'une technique immunologique automatisée de capture des IgM sur des microparticules couplées à une détection par chimioluminescence. Le développeur annonce une sensibilité de 87,5% et une spécificité variant entre 98,4% et 100,0% selon les cohortes utilisées (FDA).

Enfin, le troisième test approuvé par la FDA est un kit développé par Diasorin Inc., LIAISON XL Zika Capture IgM Assay II. Il permet la détection des IgM dirigés contre la protéine NS1 dans le sérum par une technique immunologique automatisée de capture des IgM sur des microparticules couplées à une détection par chimioluminescence. Il présente une sensibilité variant de 74,0% à 94,2% et une spécificité variant de 86,0% à 99,3% (FDA ; Sloan *et al.* 2018 ; Theel *et al.* 2018).

L'outil de diagnostic « DPP Zika IgM Assay » sous EUA, développé et commercialisé par Chembio Diagnostic Systems Inc. n'a pas encore été approuvé par la FDA. Il s'agit d'une technique d'immuno-chromatographie sur bandelettes permettant de détecter les IgM dirigés contre la protéine recombinante NS1, dans le sang total veineux ou capillaire, le plasma et le sérum. La sensibilité de détection varie de 80,0% à 95,1% et la spécificité de 98,2% à 100,0% (FDA ; Granger *et al.* 2019; Theel *et al.* 2018).

Deux autres outils référencés dans la littérature sont commercialisés et disponibles en kit. Leurs cibles ne sont pas communiquées par les développeurs, abcam et NovaTec. Ils permettent, par technique ELISA, de détecter les IgM et IgG à partir du plasma et du sérum humain. La détection des IgM présente une sensibilité de 53,3% et 43,3% pour une spécificité de 90,0% et 70,0% pour les ELISA développés par abcam et NovaTec respectivement. Les études ont été menées sur une cohorte de 30 sérums positifs à ZIKV et 10 positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV (Safronetz *et al.* 2017).

De nombreux autres outils de diagnostic sont référencés dans la littérature mais ne sont pas commercialisés. Parmi eux, l'ELISA développé par le CDC est sous EUA. Il permet la détection des IgM dirigés contre des particules ZIKV recombinantes non infectieuses, à partir du sérum de patients avec une sensibilité de 94,0% pour une spécificité de 30,9% (FDA ; Theel *et al.* 2018). Plusieurs autres tests utilisant la technologie ELISA avec différentes cibles : particules virales ZIKV, protéine recombinante NS1 ou protéine recombinante E mutée dans la boucle de fusion (Protéine E FL mutant), ont également été publiés. Certains permettent la détection des IgM, des IgG ou des deux sans distinction. Leur sensibilité et spécificité ont été déterminées par l'étude de cohortes de taille très variables et sont présentés dans la Table 2. Seules les performances du test NS1 Blockade-of-Binding ELISA ont été étudiées en fonction du stade précoce ($16,7 \pm 2,9$ jours) ou tardif (≈ 7 mois ± 29 jours) de la maladie avec une sensibilité de 85,0 % et 96,5% et une spécificité de 91,4% et 92,6% respectivement (Balmaseda *et al.* 2018).

Table 2. Caractéristiques de différents tests ELISA non commercialisés.

Référence	Nom du test	Cible	Détection	Taille échantillon	Sensibilité	Spécificité
1	NS1 BOB ELISA	NS1	IgM + IgG	158 Z / 171 F	91,80%	88,90%
2	ND	NS1	IgM	40 Z / 33 F / 8 N	72,50%	97,40%
			IgG	40 Z / 40 F / 12 N	50,00%	66,70%
3	Equad	Protéine E FL mutant	IgM	16 Z / 70 F / 17 N	87,50%	94,30%
			IgG	39 Z / 78 F / 17 N	100,00%	97,90%
4	CNDR MAC-ELISA	ZIKV	IgM	127 Z / 97 F / 77 N	94,50%	85,60%
	NIAID-BEI MAC-ELISA		IgM		70,10%	82,80%
	Inhibition ELISA Method		IgM + IgG		68,30%	58,80%

Abréviations : BOB, Blockade-of-Binding. ND, Non Documenté. Z, sérums positifs à ZIKV. F, sérums positifs aux *Flavivirus* autre que ZIKV. N, sérums négatifs. (1) Balmaseda *et al.* (Balmaseda *et al.* 2017). (2) Tsai *et al.* (Tsai *et al.* 2017). (3) Rockstroh *et al.* (Rockstroh *et al.* 2017). (4) Balmaseda *et al.* (Balmaseda *et al.* 2018).

La protéine recombinante NS1, largement utilisée dans les tests ELISA, a également été couplée à des billes magnétiques et permet de détecter les IgM et IgG avec une sensibilité de 88,0% et 97,0% respectivement et une spécificité de 100,0% pour les 2 tests (Michelson *et al.* 2019). Des peptides issus de NS1 ont également été immobilisés sur des puces permettant ainsi de reproduire les épitopes en s'affranchissant des séquences peu spécifiques. La sensibilité et la spécificité ne sont pas exactement connues, mais la sensibilité de détection des IgG est supérieure à 70,0% et la spécificité supérieure à 80,0% (Sola *et al.* 2018).

Enfin, deux autres techniques, utilisant comme cible la protéine recombinante du domaine III de la protéine E de ZIKV pour la détection des IgG, ont été développées et utilisées pour mesurer la séroprévalence à ZIKV dans la population de Polynésie Française. Cependant, aucune évaluation de la performance en termes de sensibilité et spécificité n'ont été menées. Il s'agit ici d'une technique ELISA et d'une technique immunologique basée sur des microsphères (Microsphere ImmunoAssay, MIA) (Aubry *et al.* 2015 ; Aubry *et al.* 2017). D'autres techniques ELISA permettent la détection des IgG avec cette même protéine et concluent que le DIII pourrait être une cible prometteuse pour le diagnostic mais les performances du test n'ont pas été mesurées (Premkumar *et al.* 2018; Yu *et al.* 2017).

IX. Problématiques liées aux *Flavivirus*

1. Séroprévalence au ZIKV

Les études de séroprévalence sont nécessaires puisqu'elles permettent une visibilité de la couverture immunitaire face aux maladies infectieuses et ainsi l'évaluation du risque épidémique. Elles restent difficiles à mettre en œuvre par le manque de test de référence qui permettrait également de différencier les *Flavivirus* co-circulant (Fritzell *et al.* 2018). Plusieurs études de séroprévalence ZIKV ont été réalisées mettant en œuvre des techniques immunologique différentes. On retrouve, pour la détection des IgM et des IgG anti-ZIKV, des techniques ELISA basées sur différentes cibles antigéniques, des techniques basées sur des microsphères et de la séroneutralisation. De plus, ces essais ont été menés sur des populations différentes et révèlent une hétérogénéité de séroprévalence entre les continents et les pays. Les différences observées dans les résultats peuvent alors avoir plusieurs origines rendant la comparaison et l'étude de l'évolution de cette séroprévalence difficile.

L'étude du profil de séroprévalence en Afrique est limitée puisque seule deux études ont été menées dont une au Cameroun en 2015 où la séroprévalence globale observée chez des donneurs de sang était faible, environ 5% (Gake *et al.* 2017). Cette donnée peut s'expliquer par le fait que le lignage africain de ZIKV n'a pas été impliqué dans de grandes épidémies contrairement au lignage asiatique.

Dans les pays où le lignage asiatique de ZIKV a circulé, de nombreuses études de séroprévalence ont été effectuées. En Micronésie dans les Îles de Yap, suite à l'épidémie de 2007, la séroprévalence était de 73% dans la population générale (Duffy *et al.* 2009). En Polynésie française, une étude de séroprévalence a été réalisée chez des donneurs de sang de 2011 à 2013 avant l'épidémie. Seul 0,8 % de la population présentait une cicatrice sérologique contre ZIKV (Aubry *et al.* 2015). Après l'épidémie, cette séroprévalence était de 49 % dans la population générale et de 66% chez les enfants (Aubry *et al.* 2017). Enfin, suite à la dernière épidémie de 2015 à 2016, la séroprévalence au Brésil était de 63,3 % dans la population générale (Netto *et al.* 2017), de 42,2 % en Martinique (Gallian *et al.* 2017), et de 21,5% à 39% en Bolivie (Saba Villarroel *et al.* 2018).

Les séroprévalences sont résumées et représentés sous forme de graphique dans la Figure 10.

L'immunité collective également appelée l'immunité grégaire permet de limiter la propagation d'une maladie infectieuse dans une population lorsqu'un certain seuil d'immunité est atteint. Dans le cas des infections ZIKV le seuil d'immunité collective a été estimé à 56,5% (Massad *et al.* 2019). Pour certains de ces pays ayant déjà vécu une épidémie à ZIKV, la séroprévalence se situe en dessous de ce seuil permettant une nouvelle circulation et transmission du virus sur ces territoires et potentiellement le développement d'une épidémie.

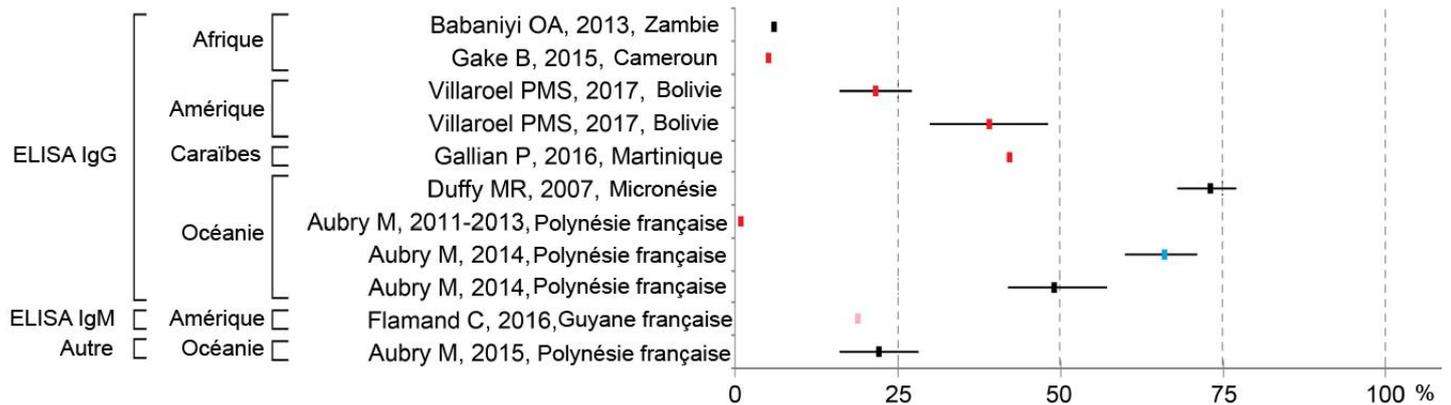


Figure 10. Taux de séroprévalence ZIKV selon la population étudiée et le test sérologique employé. Avant le graphique, de gauche à droite, sont représentés les différents tests sérologiques employés, les continents puis pays de la population étudiée et enfin les différentes références des études. Sur le graphique, chaque petit rectangle de couleur représente la séroprévalence ou la moyenne de séroprévalence calculée dans l'étude associée à son intervalle de confiance de 95%. Différentes couleurs sont employées selon la population étudiée, en noir, population générale, en bleu, enfants, en rouge, donneurs de sang, en rose, femmes enceintes. Figure modifiée de Fritzell *et al.* (Fritzell *et al.* 2018).

2. Co-endémies

ZIKV circule dans les zones tropicales et sous-tropicales, en Amérique latine et les Caraïbes, en Afrique, en Asie et en Océanie où de nombreux arbovirus, comme la DENV, les virus du West Nile et du chikungunya sont endémiques (Figure. 11) (Azeredo *et al.* 2018 ; Carrillo-Hernandez *et al.* 2018 ; Rodriguez-Morales *et al.* 2016 ; Rothan *et al.* 2018 ; Ruchusatsawat *et al.* 2019; Slavov *et al.* 2019). Par exemple, la séroprévalence DENV était de 80,3% en Polynésie française en 2013 (Aubry *et al.* 2015) et celle de ZIKV de 49% en 2014-2015 (Aubry *et al.* 2017). En plus, de pouvoir transmettre les mêmes arbovirus, les vecteurs peuvent être co-infectés et transmettre plusieurs virus simultanément (Rodriguez-

Morales *et al.* 2016 ; Rothan *et al.* 2018 ; Wu *et al.* 2019). Les individus peuvent également être co-infectés. Le cas a été décrit au Brésil et en Colombie pendant l'épidémie de ZIKV en 2016 où certains patients ont été co-infectés par les DENV, ZIKV et/ou CHIKV allant même jusqu'à des triples infections. Ces dernières ne sont pas anecdotiques puisque l'incidence se situe, selon l'étude, entre 13,4 et 5,1 % pour les doubles infections et 1,9 % pour les triples infections (Azeredo *et al.* 2018 ; Carrillo-Hernandez *et al.* 2018).

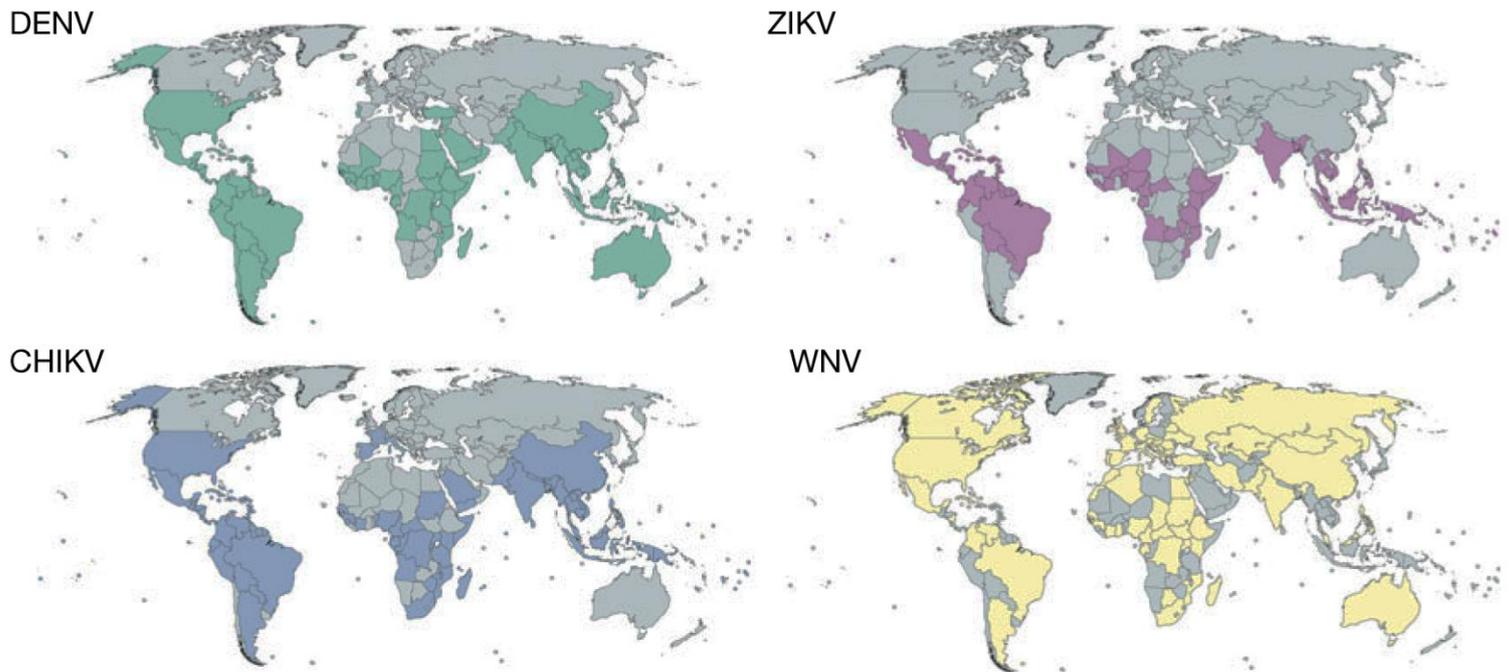


Figure 11. Circulation mondiale de différents arbovirus, DENV, ZIKV, CHIKV et WNV (Wu *et al.* 2019).

3. Pathologies semblables

La co-circulation des *Flavivirus* ne facilite pas le diagnostic rapide d'une infection ZIKV. En effet, comme nous avons pu le voir au cours des nombreuses épidémies ZIKV, le tableau clinique conduit souvent *a priori* à l'identification des cas comme des infections DENV. Les symptômes ZIKV sont d'ailleurs caractérisés comme étant 'Dengue-like'. Les arboviroses sont généralement des maladies fébriles sans symptômes particulier. Des patients Brésiliens, au nombre de 433, ont été suspectés d'infection par ZIKV, selon le seul profil clinique. Seuls 168 (38,8%) étaient réellement liés à des arbovirus, 96 dus au ZIKV (22,2%), 67 à la DENV (15,5%), 4 co-infections par ZIKV et la DENV (0,9%) et 1 par le CHIKV (0,2%). Les symptômes les plus communs, parmi les 96 cas confirmés d'infection au ZIKV

par un laboratoire, étaient une éruption cutanée (100%), des arthralgies (77,1%), de la fièvre (74,0%), des myalgies (74,0%) et des conjonctivites non-purulentes (69,8%) et les symptômes les plus communs, parmi les 67 cas confirmés d'infection par la DENV, étaient une éruption cutanée (100%), de la fièvre (79,1%), des myalgies (74,6%), des maux de tête (73,1%) et des arthralgies (70,1%) (Colombo *et al.* 2017).

L'association de ce tableau clinique, commun aux arboviroses, et la co-circulation des *Flavivirus* rend difficile mais nécessaire le développement de diagnostic rapide et fiable (Rodriguez-Morales *et al.* 2016).

4. Réactivité croisée, neutralisation et ADE, impact sur les infections secondaires et le diagnostic spécifique

a. Neutralisation croisée et Antibody Dependant Enhancement, ADE

La réactivité croisée des anticorps a été particulièrement décrite pour les différents sérotypes de DENV. Ces sérotypes partagent entre 70 et 80% d'homologie de séquence protéique (Flipse *et al.* 2013). Les patients ayant déjà été infecté par la DENV présentent, lors d'une seconde infection par un sérotype de DENV hétérologue, un profil de réponse immunitaire secondaire. Cette réponse est alors majoritairement dirigée contre le sérotype de DENV initial avec environ 45% des lymphocytes B circulant spécifique de ce sérotype et 10% spécifique du sérotype de DENV néo-infectant. Les IgG induits lors de cette seconde infection présentent une avidité plus élevée pour le sérotype initial mais une capacité de neutralisation *in vitro* des quatre sérotypes. Les lymphocytes B à réaction croisées sont donc en grande partie induits lors de cette seconde infection hétérologue (Zompi *et al.* 2012). Bien que ces anticorps neutralisent *in vitro* les sérotypes de DENV hétérologue, il est observé lors d'infection de DENV secondaire des symptômes plus graves avec notamment des hospitalisations pour des fièvres hémorragiques sévères. L'immunité préexistante contre un sérotype de DENV serait à l'origine de ces symptômes plus graves. Ce processus est appelé la facilitation dépendante des anticorps (Antibody Dependant Enhancement, ADE) (Aguiar *et al.* 2016a; Stettler *et al.* 2016).

Les anticorps non spécifiques sont capables d'opsonisation lorsqu'ils sont présents à forte concentration. A plus faible concentration ils vont, au contraire, être facilitant et provoquer une ADE. Les anticorps séroneutralisants ont été globalement caractérisés comme étant spécifiques et sont à l'origine du concept de sérotype, néanmoins lorsqu'ils sont peu

concentrés et que leur quantité n'est pas suffisante pour bloquer tous les antigènes viraux, ils peuvent être eux aussi être à l'origine d'une ADE (Shim *et al.* 2019).

L'ADE est un phénomène en partie observée en présence d'anticorps non-spécifiques du sérotype impliqué dans la réaction croisée contre la E-glycoprotéine et la prM. Néanmoins, lorsque la concentration en anticorps, malgré leur capacité éventuelle à neutraliser, est inférieure à la concentration limite requise pour neutraliser, ils échouent et, au contraire, facilitent l'interaction du virus avec la cellule et finalement l'internalisation du virus. La première étape de ce phénomène est un rapprochement physique du complexe virus-IgG et de la cellule immunitaire par l'intermédiaire de la partie Fc des anticorps reconnue par les Récepteurs au Fragment constant des Ig (Rfc) présents à la surface des cellules immunitaire (Castanha *et al.* 2020; Flipse *et al.* 2013). La suite du processus n'est pas encore très bien connue mais la neutralisation du virus n'étant pas optimale, il est probable que ce rapprochement facilite l'interaction du virus avec ses récepteurs membranaires ou que le faible pH de l'endosome permette le changement de conformation des protéines d'enveloppe induisant ainsi l'exposition des boucles de fusion puis la fusion membranaire et *in fine* le relargage du virus dans le cytoplasme de la cellule (Flipse *et al.* 2013). Ce processus couplé à une inhibition de la réponse immunitaire innée entraîne l'augmentation de la réplication virale, le nombre de cellules infectées, l'activation des LT mémoires capables de réaction croisée et diminue la dose virale nécessaire pour une infection (Castanha *et al.* 2020; Flipse *et al.* 2013). La pathologie est alors intensifiée et les symptômes plus sévères.

Les séquences protéiques des *Flavivirus* sont très homologues et les structure des protéines et des particules virales très conservées (Dai *et al.* 2016 ; Kostyuchenko *et al.* 2016 ; Sirohi *et al.* 2016 ; Sirohi *et al.* 2017). En effet les domaines I, II et III de la protéine d'enveloppe de ZIKV et DENV partagent 35%, 51% et 29% d'identité de séquence en acides-aminés respectivement (Stettler *et al.* 2016). Il est donc proposé que cette réactivité croisée des anticorps soit également possible entre les différents *Flavivirus*. Ce postulat est appuyé par le fait que les lymphocytes B mémoires sélectionnés et ayant produits des anticorps suite à une première infection par un *Flavivirus* peuvent, lors d'une seconde infection hétérologue, être réactivés et ainsi produire de nouveaux ces anticorps capables de reconnaître ce second virus de séquence proche (Bhaumik *et al.* 2018; Rogers *et al.* 2017).

Comme nous l'avons mentionné, les épitopes B impliqués dans la réactivité croisée sont retrouvés sur les protéines de surface du virus (la protéine E et la prM / M). La grande

majorité de ces épitopes sont retrouvés sur la protéine E. Dans une étude, 65% des anticorps monoclonaux (mAb) humains ciblent les EDI ou EDII, seuls 10% ciblent le EDIII (Stettler *et al.* 2016). Les anticorps dirigés contre le DI/DII ciblent majoritairement la boucle de fusion (Fusion-Loop Epitope, FLE) présente dans le EDII et l'interface entre les deux sous unités du dimère de la protéine E (E-Dimer Epitope, EDE) masqué par le peptide pr dans le virion immature. Ce dernier est un épitope de structure quaternaire (Barba-Spaeth *et al.* 2016). Des réactivités croisées observées avec des lymphocytes T ciblent les protéines structurales et non structurales (Grifoni *et al.* 2017; Wen *et al.* 2017) mais celles-ci ne seront pas développées dans ce manuscrit.

De nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre ces réactivités croisées complexes (Castanha *et al.* 2020; Dai *et al.* 2016 ; Dejnirattisai *et al.* 2015 ; Deng *et al.* 2011 ; Kawiecki *et al.* 2016 ; Stettler *et al.* 2016 ; Wang *et al.* 2017 ; Willis *et al.* 2017). Par exemple des anticorps monoclonaux humains initialement dirigés contre la DENV sont impliqués dans la réactivité croisée contre ZIKV. Dans la littérature la majorité des mAb dirigés contre EDIII sont décrits comme ayant une activité neutralisante. En effet, un mAb humain, dirigé contre le EDIII, neutralise ZIKV *in vitro* et protège des souris contre une infection létale au ZIKV (Robbiani *et al.* 2017). Les anticorps dirigés contre les EDE présentent également un profil neutralisant de ZIKV *in vitro* et protègent la souris contre une infection létale de ZIKV (Fernandez *et al.* 2017; Swanstrom *et al.* 2016). On distingue 2 sous-types d'anticorps anti-EDE selon leur sensibilité à la glycosylation en position Asn154 ; les anticorps anti-EDE de type 2 présentent une affinité plus faible pour l'épitope en absence du glycane tandis que les anticorps anti-EDE de type 1 n'y sont pas sensible et présentent une plus forte capacité de neutralisation (Barba-Spaeth *et al.* 2016). Cependant ces anticorps anti-EDE sont également capables d'induire de l'ADE *in vitro* lorsqu'ils sont employés à des concentrations sous-neutralisantes (Dejnirattisai *et al.* 2016). Enfin, les anticorps dirigés contre le FLE, accessible grâce à la fluidité du virus (« breathing ») (Barba-Spaeth *et al.* 2016), sont également capables de neutraliser ZIKV à certaines concentrations *in vitro* (Paul *et al.* 2016), mais présentent un profil majoritairement pro-ADE *in vitro* (Dejnirattisai *et al.* 2016 ; Paul *et al.* 2016).

Les études réalisées avec les mAbs reflètent moins la réponse immunitaire humorale physiologique que celles réalisées avec les plasmas de patients infectés (anticorps polyclonaux). Les résultats obtenus restent toutefois complémentaires, les uns permettant de comprendre la fonctionnalité individuelle de l'anticorps et les autres permettant de les

replacer dans une concentration physiologique respectant leur proportion plasmatique. Ainsi, des plasmas de patients infectés initialement par la DENV neutralisent ZIKV *in vitro* (Montoya *et al.* 2018; Paul *et al.* 2016 ; Priyamvada *et al.* 2016) ou au contraire induisent une ADE lors d'infection ZIKV *in vitro* (Dejnirattisai *et al.* 2016 ; Paul *et al.* 2016), de placentas humains *in vitro* (Hermanns *et al.* 2018) ou *in vivo* amplifiant la morbidité et la mortalité des souris (Bardina *et al.* 2017). L'intensité de ces phénomènes varie selon la dilution des échantillons utilisés (Paul *et al.* 2016) ou de la date de la dernière infection (Montoya *et al.* 2018). De plus, la neutralisation croisée reste d'une magnitude plus faible que la neutralisation observée envers le sérotype de DENV initialement infectant et, d'une façon générale, plus faible que vis-à-vis des autres sérotypes de DENV. Ce phénomène reste peu fréquent ; moins de 30 % des plasmas de patients sont capables de neutraliser plusieurs *Flavivirus* (Montoya *et al.* 2018; Swanstrom *et al.* 2016).

Les raisons qui séparent une neutralisation croisée et une ADE sont encore mal comprises. Il est difficile de classer les anticorps sériques de manière certaine puisque la neutralisation croisée et l'ADE sont deux phénomènes dépendants de leur concentration. Ainsi, un anticorps neutralisant, présent à une concentration inférieure à son affinité, induit une ADE alors que présent en concentration suffisante il sera neutralisant (Bardina *et al.* 2017 ; Kawiecki *et al.* 2016 ; Montoya *et al.* 2018; Paul *et al.* 2016) et par opsonisation entraînera sa phagocytose par les macrophages et les cellules dendritiques. Une distance est également à prendre face aux résultats obtenus avec un anticorps monoclonal et la réalité d'une infection qui met en œuvre des anticorps polyclonaux. En effet, des anticorps présents dans les plasmas de patient infectés peuvent neutraliser *in vitro* et les mAbs issues de ces patients peuvent entraîner de l'ADE lors d'infections *in vitro* (Priyamvada *et al.* 2016). Il est donc évident que les résultats obtenus avec des anticorps monoclonaux doivent être remis dans un contexte sérologique plus global, la concentration de chacun d'entre eux pouvant faire basculer la réponse immunitaire vers une neutralisation ou bien une ADE. Cela n'enlève rien au potentiel des mAbs, impliqués dans la réaction croisée, pour l'immunothérapie.

Jusqu'à présent, il n'y a aucune étude mettant en évidence, *in vivo* chez les PNH ou les Hommes une ADE d'une infection ZIKV dans un contexte de cicatrice immunologique DENV (Sariol *et al.* 2018). Toutefois, suite aux épidémies ZIKV, beaucoup moins de cas de DENV ont été recensés ce qui pourrait sous-entendre une neutralisation croisée des anticorps anti-ZIKV avec la DENV (Montoya *et al.* 2018 ; Ribeiro *et al.* 2018).

L'étude et la compréhension de la reconnaissance croisée menant à une neutralisation non spécifique d'une part, ou à une ADE d'autre part sont primordiales, notamment pour le développement de vaccins, d'outils de diagnostic mais aussi d'immunothérapies. Certains épitopes spécifiques sont les cibles d'anticorps neutralisants, sans jamais induire d'ADE. Les épitopes non spécifiques peuvent être des cibles d'anticorps neutralisants ou bien induisant une ADE. Seuls les antigènes dont la séquence est spécifique au virus seront de bons candidats pour être une base vaccinale ou de diagnostic fiable.

Cette réactivité croisée associée au tableau clinique commun des arboviroses et la co-circulation des *Flavivirus* ne facilitent pas le diagnostic rapide et fiable qui n'en reste pas moins important au vu des complications neurologiques et congénitales qu'une infection ZIKV implique.

b. Impact sur le diagnostic

Comme nous l'avons vu précédemment, le diagnostic se base dans un premier temps sur la détection du génome viral dans les fluides corporels. Cependant, la fenêtre de virémie post-symptômes est très courte et limite le diagnostic direct nous orientant donc sur des tests sérologiques.

Lors d'une infection secondaire par un *Flavivirus*, la réponse immunitaire humorale par la production d'IgM est souvent faible voire inexistante. Les tests de détection des IgG deviennent alors la méthode de choix. Cependant la spécificité de détection est entravée par la forte réactivité croisée des IgG anti-flaviviraux conduisant à des résultats de diagnostic faussement positifs (Rockstroh *et al.* 2017). Cette réactivité croisée est fréquemment rencontrée puisque la majorité des infections ZIKV ont lieu dans les zones endémiques des *Flavivirus* et notamment de DENV. Par exemple, en Guadeloupe et Martinique, fortement impactés par l'épidémie de ZIKV en 2016, la séroprévalence à la DENV de la population adulte en 2011 dépassait 90% (L'Azou *et al.* 2015). Ainsi pour confirmer les résultats de diagnostic, les laboratoires de diagnostic, comme le Centre National de Référence des arbovirus, doivent effectuer des tests de séroneutralisation virale en laboratoire confinés de niveau 3 permettant ainsi de déterminer la spécificité des anticorps (Rockstroh *et al.* 2017). Ces expérimentations demandent beaucoup de temps, sont coûteuses et la production de virions viables est peu reproductible. Il est donc difficile de les mettre en œuvre dans le cadre d'un diagnostic de routine.

Face à cette problématique il est donc important et nécessaire de développer des techniques faciles et rapides à utiliser en routine avec une sensibilité et une spécificité élevées afin de poser un diagnostic fiable (Rockstroh *et al.* 2017). Les tests de diagnostics basés sur les virions entiers ou les protéines E sont peu fiables sans doute à cause de la réactivité croisée des anticorps reconnaissant des épitopes communs comme par exemple la boucle de fusion présente dans le DII. Ils ne sont donc pas assez spécifiques et ne font pas des cibles de choix pour le développement d'outils de diagnostic spécifiques (Tsai *et al.* 2017). Cependant seul 10% des anticorps monoclonaux dirigés contre le DIII de la protéine E sont impliqués dans les réactions croisées ce qui en fait un bon candidat pour le développement d'un outil de diagnostic fiable (Stettler *et al.* 2016).

X. La protéine d'enveloppe, cible des anticorps

1. La protéine d'enveloppe du virus Zika, la E-glycoprotéine

La protéine d'enveloppe, aussi appelée la E-glycoprotéine ou encore la protéine E, est composée de 500 résidus d'acides aminés pour une masse de 54 kDa. Elle est constituée de trois domaines distincts (I, II et III) constituée majoritairement de feuillet bêta et d'un domaine transmembranaire (Sirohi *et al.* 2016) (Figure 12) :

- Le domaine I (DI), en N-terminal, relie les deux autres domaines. Il contient environ 130 résidus d'acides aminés organisés en feuillet β . Ce domaine contient une N-glycosylation sur l'asparagine 154 (Asn154), elle est située dans la « boucle 150 », à proximité de la boucle de fusion de la protéine E et est projetée vers l'extérieur (Dai *et al.* 2016 ; Kostyuchenko *et al.* 2016 ; Rey *et al.* 2018; Sirohi *et al.* 2016). On lui prête de nombreux rôles, notamment le contrôle de l'accès de la boucle de fusion aux solvants, le contrôle de la fusion membranaire ou encore la progression des virions dans la voie de sécrétion et l'échappement immunitaire (Fontes-Garfias *et al.* 2017 ; Mossenta *et al.* 2017 ; Rey *et al.* 2018; Sirohi *et al.* 2016). Elle est majoritairement absente chez les souches africaines mais présente chez les souches asiatiques (May *et al.* 2016).
- Le domaine II (DII) contient la boucle de fusion qui interagit avec la membrane de l'endosome lors de la fusion. Il est également impliqué dans la dimérisation des protéines. Il est constitué d'environ 165 résidus d'acides aminés organisés en feuillet β de type finger-like (Dai *et al.* 2016 ; Kostyuchenko *et al.* 2016).

- Le domaine III (DIII) contient le site d'interaction avec les récepteurs cellulaires. Il est constitué d'environ 110 résidus d'acides aminés organisés en feuillet β de type Ig-like.
- Le domaine transmembranaire, en C-terminal, est relié au DIII et ancre la protéine E dans la membrane. Il est constitué d'environ 100 résidus d'acides aminés organisés en hélices α .

La charnière entre le DI et le DII est importante pour le basculement du DII et l'exposition de la boucle de fusion lors de la fusion membranaire tandis que la charnière entre le DI et le DIII est rigide à pH neutre (Dai *et al.* 2016 ; Kostyuchenko *et al.* 2016 ; Sirohi *et al.* 2016). La protéine E partage une forte homologie au sein des *Flavivirus* notamment avec la DENV, pour lesquels on observe respectivement 35 %, 51 % et 29 % d'homologie de séquence en résidus d'acides aminés entre les DI, DII et DIII (Stettler *et al.* 2016).

On dénombre 180 monomères de cette protéine E à la surface du virion. Dans le virion mature, chaque monomère s'associe à un autre monomère pour former un homodimère, on dénombre alors 90 dimères de la protéine E à la surface du virion (Barba-Spaeth *et al.* 2016; Kostyuchenko *et al.* 2016).

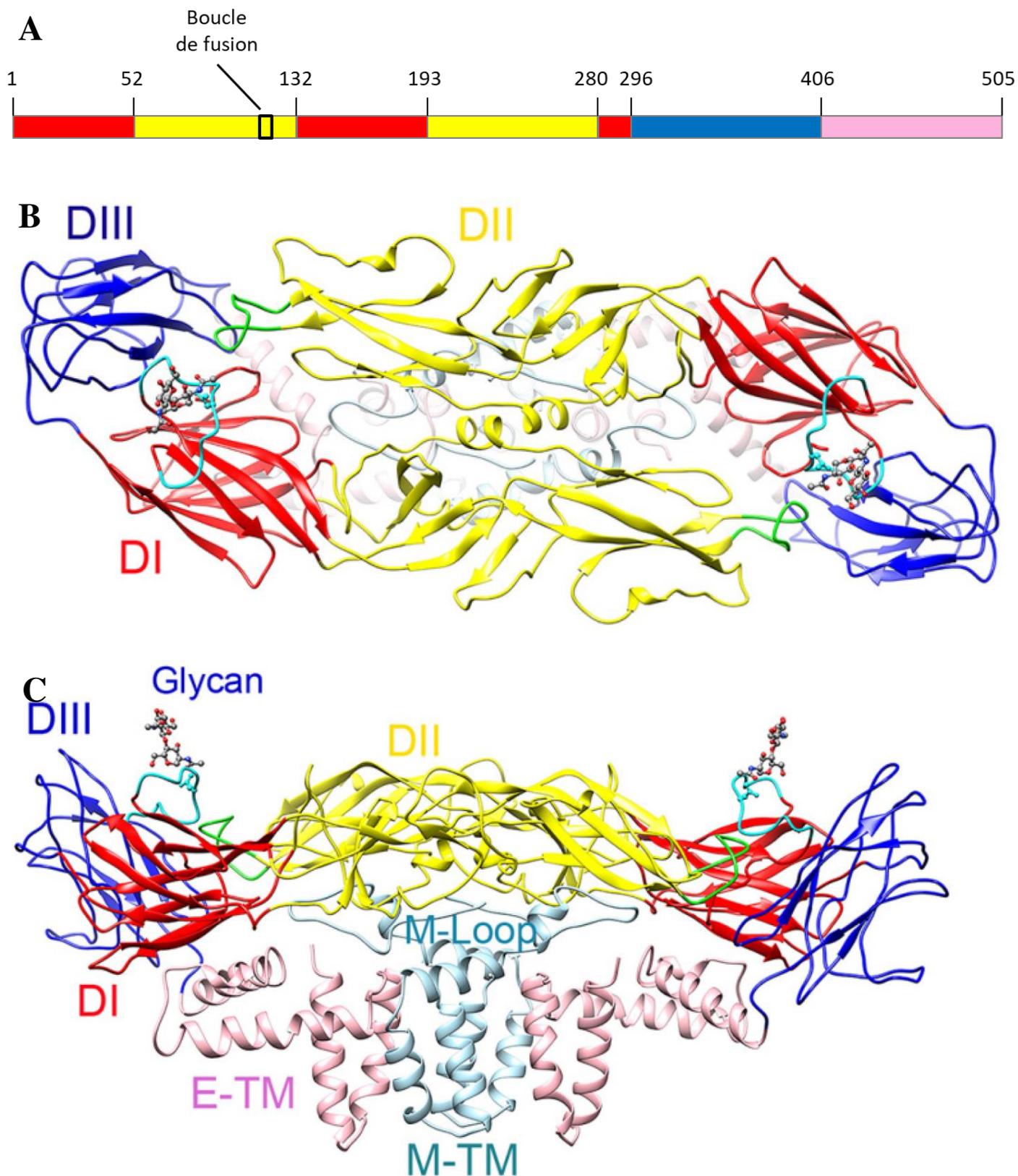


Figure 12. Structure linéaire et tridimensionnelle de la protéine E de ZIKV. **A.** Schéma de l'organisation des différents domaines de la protéine E le long de la séquence. Le Domaine I (rouge), le Domaine II (jaune), le Domaine III (bleu), la boucle de fusion (encadré noir), le

domaine transmembranaire (rose) composent la protéine d'enveloppe. (Figure modifiée de l'article de Dai *et al.* (Dai *et al.* 2016)) **B.** Structure tridimensionnelle du dimère de la protéine E. Domaine I (rouge), le Domaine II (jaune), le Domaine III (rouge), la boucle de fusion (vert), la boucle 150 (en cyan) contenant la N-glycosylation en position Asn 154, le domaine transmembranaire (rose) de la protéine d'enveloppe, la protéine de membrane (bleu clair). La protéine d'enveloppe et le domaine transmembranaire sont enchâssés dans la bicouche lipidique. (D'après Sirohi *et al.* (Sirohi *et al.* 2016), numéro d'accèsion PDB [5IRE]) **C.** Vu en rotation de 90° du dimère de la protéine E. Le code couleur utilisé est le même que pour le B. (D'après Sirohi *et al.* (Sirohi *et al.* 2016), numéro d'accèsion PDB [5IRE]).

2. La protéine recombinante DIII, une cible pour le développement d'un outil de diagnostic spécifique

La protéine d'enveloppe de ZIKV est très homologue à celle des autres *Flavivirus*. Le domaine III est le domaine qui partage le moins d'homologie des trois domaines au sein des *Flavivirus* (Stettler *et al.* 2016) et de nombreuses mutations sont trouvées le long de sa séquence. Celles-ci sont le signe d'une adaptation du virus à l'hôte (vecteurs, réservoirs et Homme) et à ses défenses immunitaires ce qui suggère l'implication de ce domaine dans l'infectiosité et l'échappement immunitaire (Sirohi *et al.* 2016). Le DIII est impliqué dans l'adhésion du virus à la cellule hôte et est l'une des cibles des anticorps neutralisants (Zhang *et al.* 2010). Pour toutes ces raisons, il semble que les anticorps dirigés contre ce domaine pourraient être des marqueurs viraux spécifiques.

La protéine recombinante du DIII serait une bonne cible pour la détection des anticorps spécifiques de ZIKV dans le sérum ou le plasma des patients. En effet, les anticorps dirigés contre le DIII de la protéine d'enveloppe présentent 90% de spécificité virale contre 65% pour le DI ou le DII (Stettler *et al.* 2016). Ces anticorps sont également capables de neutraliser le virus contrairement aux anticorps dirigés contre le DI ou le DII (Magnani *et al.* 2017 ; Stettler *et al.* 2016 ; Wang *et al.* 2016b ; Wu *et al.* 2017 ; Yu *et al.* 2017 ; Zhao *et al.* 2016) et persistent plusieurs mois dans le plasma (Yu *et al.* 2017). De plus, des anticorps induits lors d'une immunisation d'un modèle murin avec la protéine recombinante du DIII de ZIKV sont spécifiques et neutralisent le virus (Yang *et al.* 2017). Toutes ces études amènent donc à penser que le DIII de ZIKV est une protéine immunogène du virus et surtout spécifique.

Des outils de détections d'anticorps spécifiques des *Flavivirus* ont déjà été développés sous forme de techniques MIA, ELISA et immunofluorescence. Certains d'entre eux, utilisant

le DIII, existent déjà pour la détection d'anticorps dirigés contre l'encéphalite à tiques (Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV) (Holbrook *et al.* 2004), le WNV (Beasley *et al.* 2004) et la DENV (Wahala *et al.* 2009). La fiabilité de ces diagnostics n'a pas été déterminée pour toutes les techniques néanmoins le DIII issu de ces virus paraissait déjà être une bonne cible de détection spécifique. Le développement de ces outils sous forme de méthode ELISA basés sur la reconnaissance d'une protéine recombinante comme la protéine NS1 ou bien encore le DIII est intéressant car ceux-ci sont sensibles, spécifiques, rapides à mettre en œuvre et les molécules utilisées sont, contrairement aux virus entiers inactivés, stables, non-dangereuses et peu coûteuses à produire. Pour toutes ces raisons, ce type d'outils est utilisable en routine dans un laboratoire.

XI. Problématique de la thèse

Une cible virale destinée à être un outil de sérodiagnostic se doit d'être le plus spécifiquement reconnu par les anticorps pour son utilisation en zone de co-endémie flavivirale où les anticorps induits présentent une reconnaissance croisée. Par ailleurs, les anticorps présentant une reconnaissance croisée peuvent, lors d'une infection flavivirale secondaire hétérologue, induire une aggravation de la pathologie (ADE). Le point commun et critique entre un outil de diagnostic fiable et un vaccin efficace et sûr est la spécificité de reconnaissance par les anticorps de la molécule utilisée. Ainsi, il est primordial de développer une molécule cible et inductrice d'anticorps les plus spécifiques permettant la conception d'un outil de diagnostic le plus fiable et potentiellement applicable à une base vaccinale.

Lorsque nous avons débuté ces travaux, les résultats sur le virus Zika étaient encore peu nombreux. Néanmoins, de nombreux articles étaient déjà publiés et caractérisaient les *Flavivirus* et leur domaine III, notamment pour le virus de la dengue. Il a été montré qu'une grande partie des anticorps neutralisants un *Flavivirus* étaient spécifiques de ce *Flavivirus*. Depuis, il a été montré que le domaine III de la protéine d'enveloppe de ZIKV est une cible de ces anticorps neutralisants, en effet, ils bloquent l'entrée du virus en s'y fixant. Nous avons donc fait l'hypothèse que ce ZEDIII pourrait être une cible spécifique du virus.

Les travaux de cette thèse furent donc multiples : (i) le développement d'un outil de sérodiagnostic ELISA en utilisant comme cible des anticorps la protéine recombinante du Domaine III de ZIKV. Nous avons caractérisé les paramètres de sensibilité et de spécificité de détection des IgG à l'aide de différentes cohortes. Nous avons également étudié la cinétique d'apparition et de persistance des IgG dans le sérum de militaires infectés par ZIKV, en

mission dans une zone endémique, à l'aide de cet outil de diagnostic et déterminé la fenêtre d'emploi de cet outil. (ii) Le suivi de la réponse immunitaire humorale suite à l'immunisation d'un modèle murin avec le DIII et l'évaluation de la protection induite face à un challenge viral. (iii) la caractérisation de la réponse d'anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine III afin d'obtenir de nouveaux outils pour le diagnostic visant à détecter le virus (ELISA indirect, immunofluorescence). Le centre de cette étude fut donc le domaine III de la protéine d'enveloppe et ses rapports au système immunitaire humoral.

RESULTATS

I. Développement et applications d'un outil de diagnostic sérologique spécifique des infections ZIKV chez l'Homme

1. Etude des performances de l'outil de détection des IgG pour le diagnostic d'infections au ZIKV - Article 1

a. Introduction

Le virus Zika (ZIKV) co-circule avec les 4 sérotypes du virus de la dengue (DENV) dans de nombreuses zones endémiques. Leurs signes cliniques associés à leur infection sont similaires, il est donc difficile d'établir un diagnostic basé uniquement sur les symptômes. Le diagnostic s'effectue alors en cherchant le génome par RT-PCR, ou bien des anticorps induits par le virus, par ELISA ou séroneutralisation. La fenêtre de virémie est relativement courte, 4 jours après l'apparition des symptômes, la recherche du génome n'est donc pas toujours pertinente. Le diagnostic sérologique est rapide à mettre en œuvre et pertinent même plusieurs semaines après le premier jour des symptômes, et ce, malgré les réactivités croisées d'anticorps dirigées contre les *Flavivirus* à l'origine de sa faible spécificité. Le diagnostic par séroneutralisation, est un processus long, entre 5 et 7 jours, et nécessite, en France, l'emploi de virus vivants dans des laboratoires de confinement de niveau 3. Sa mise en œuvre est plus difficile à utiliser en routine. Face aux complications neurologiques que peuvent engendrer les infections par ZIKV il est nécessaire de développer un outil de diagnostic rapide, spécifique et de routine utilisable par le Centre National de Référence (CNR) des arbovirus.

Le domaine III (ZEDIII) issu de la protéine d'enveloppe de ZIKV est proposé pour être une bonne cible de détection des anticorps spécifiques de ZIKV dans le sérum des patients. En effet, il ne partage qu'entre 40 et 50% d'identité de séquence en acides aminés avec le EDIII des DENV (DEDIII) (Table 1 présentée dans le chapitre I.2) et les anticorps dirigés contre le ZEDIII présentent 90% de spécificité, ils sont capables de neutraliser le virus (Stettler *et al.* 2016) et ne reconnaissent pas les EDIII de DENV2 et WNV en ELISA (Sapparapu *et al.* 2016).

Les EDIII ont été exprimées sous forme de protéines recombinantes dans un système bactérien. Elles sont stables dans le temps et non dangereuses. Leur emploi dans une méthode

ELISA permettrait donc le développement d'un outil de diagnostic sérologique rapide et spécifique de routine en laboratoire.

Bien que ces protéines soient utilisées dans de nombreuses études de séroprévalence ou pour lier une pathologie à une infection, aucune d'entre elles n'a déterminé les performances, les limites, la spécificité et sensibilité de l'ELISA basé sur le ZEDIII (Aubry *et al.* 2015 ; Aubry *et al.* 2017 ; Beck *et al.* 2015 ; Beck *et al.* 2019; Cao-Lormeau *et al.* 2016 ; Simon *et al.* 2018).

b. Principaux résultats

Dans cet article, nous avons montré que le diagnostic sérologique sous forme d'ELISA mis en œuvre au CNR des arbovirus, basé sur la reconnaissance du virus entier inactivé présente un pourcentage de réaction croisée (avec 5600 sérums) relativement faible pour les IgM, de l'ordre de 23,8%. En revanche, le pourcentage de réactions croisées observé pour les IgG avec ZIKV et DENV2 est de 71%. Les mêmes observations sont faites pour ZIKV et le virus West-Nile. La fiabilité de ce test utilisé en routine n'est donc pas suffisante pour rendre un diagnostic solide quant au virus infectant.

Au cours de mon doctorat, j'ai mis au point un outil de diagnostic ELISA ayant comme cible le ZEDIII et offrant une solution pertinente face à l'existence de cette réactivité croisée fréquente. Nous avons déterminé sa spécificité et sa sensibilité de détection des IgG induites lors d'une infection à ZIKV et nous avons comparé ses performances à celles du sérodiagnostic commercialisé par Euroimmun qui utilise comme cible la protéine NS1. Pour cela, nous avons constitué 4 groupes de patients dont les sérums étaient présents dans la sérothèque du CNR des arbovirus : (1) des sérums de patients ayant été diagnostiqués positifs pour ZIKV par RT-PCR grâce à un prélèvement précoce (n=43), (2) des sérums de patients ayant été diagnostiqués positifs en IgM contre ZIKV mais présentant un statut compatible avec la présence d'IgG (n=50), (3) des patients ayant été diagnostiqués positifs pour plusieurs *Flavivirus*, autres que ZIKV (n=99) et (4) des patients négatifs pour plusieurs *Flavivirus* (n=50). Pour conforter nos résultats, nous avons étudié la potentielle réactivité croisée des IgG humaines dirigées contre la DENV et la spécificité des IgG induit par le ZEDIII dans un modèle murin.

Nous avons obtenu une sensibilité de 92,0% et une spécificité de 89,9% de notre outil de diagnostic basé sur la reconnaissance du ZEDIII permettant une très bonne fiabilité de

détection dans des zones de co-circulation. La sensibilité de notre test ne varie pas quelle que soit la cohorte utilisée. En revanche, celle du test Euroimmun varie significativement entre 70,7% et 96,0%. La spécificité est un critère d'autant plus important en matière de diagnostic des infections flavivirales puisque d'une part la réactivité croisée des anticorps est fréquente et d'autre part, ZIKV évolue dans des zones où d'autres *Flavivirus* sont endémiques.

Afin de comparer la fiabilité de notre test de sérodiagnostic à celle du test commercial Euroimmun, nous avons calculé la valeur prédictive positive, le taux de faux positifs, la valeur prédictive négative et le taux de faux négatifs au sein d'une population hypothétique constituée de notre cohorte. La séroprévalence ZIKV de cette population hypothétique est de 33,5% proche de ce qui est observé en zone d'endémie. La probabilité d'être positif lorsqu'on est diagnostiqué positif est de 82,1% et de 75,0% avec le test basé sur le ZEDIII et le test Euroimmun respectivement alors que la probabilité d'être négatif lorsqu'on est diagnostiqué négatif est de 95,7% et 97,6% avec le test basé sur le ZEDIII et le test Euroimmun respectivement. La probabilité d'être négatif lorsqu'on est détecté positif est de 17,9% et 25,0% et la probabilité d'être positif lorsqu'on est diagnostiqué négatif est de 4,3% et 2,4% avec le test basé sur le ZEDIII et le test Euroimmun respectivement. Cependant, les différences observées sont non significativement différentes.

La probabilité de réaliser une erreur de diagnostic, dans une population présentant une séroprévalence ZIKV de 33,5%, est de 9,4% et de 12,1% lors de l'emploi de notre outil de diagnostic ou du kit Euroimmun respectivement ; cet écart n'est pas significativement différent, il nous aurait fallu une cohorte plus conséquente pour obtenir des valeurs plus solides. Notre outil de diagnostic diagnostiquerait 7,1% de patients faux-négatifs à ZIKV en moins contre 1,9% de patients faux-positifs à ZIKV en plus par rapport au sérodiagnostic commercial Euroimmun.

Les groupes d'échantillons positifs à une infection ZIKV (diagnostiqué par RT-PCR ou sérologie IgM) ont été prélevés dans une zone endémique aux *Flavivirus* et notamment avec une forte prévalence de DENV. Nous ne pouvions pas affirmer que la réaction positive observée dans notre essai sur le ZEDIII était due aux anticorps dirigés contre la DENV ou ZIKV et donc pouvait donner lieu à une réactivité croisée. Nous avons donc purifié les anticorps humains sur les D2EDIII ou D4EDIII puis testés en ELISA leur reconnaissance sur ZEDIII. Une absence totale de réactivité croisée a été observée. Par ailleurs nous avons cherché à savoir si les épitopes présents à la surface du ZEDIII pouvaient induire des

anticorps reconnaissant le D4EDIII chez la souris. Encore une fois l'absence de réactivité croisée a été observée. Ces résultats renforcent la fiabilité de notre test.

L'étude de Matheus *et al.* (Matheus *et al.* 2019) ainsi que nos résultats montrent que les IgG dirigés contre ZIKV et ZEDIII sont toujours présents même 300 jours après l'apparition des symptômes, avec un rapport de Densité Optique (rDO) à 50% de son maximum. Il sera donc possible d'étudier la séroprévalence dans une population, de mener des études rétrospectives et de proposer un diagnostic spécifique aux femmes enceintes ou prévoyant une grossesse afin de leur proposer un suivi médical particulier au vu des complications que ZIKV peut provoquer.

Article 1

High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel.

Jessica Denis, Sarah Attoumani, Patrick Gravier, Bernard Tenebray, Annabelle Garnier, Sébastien Briolant, Franck de Laval, Véronique Chastres, Gilda Grard, Isabelle Leparco-Goffart, Bruno Coutard, and Cyril Badaut

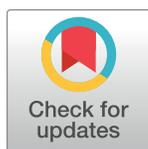
RESEARCH ARTICLE

High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel

Jessica Denis^{1,2}, Sarah Attoumani^{3,4}, Patrick Gravier^{2,4}, Bernard Tenebray^{2,4}, Annabelle Garnier¹, Sébastien Briolant^{5,6}, Franck de Laval^{7,8}, Véronique Chastres⁹, Gilda Grard^{2,4}, Isabelle Leparç-Goffart^{2,4}, Bruno Coutard^{3,4}, Cyril Badaut^{1,2*}

1 Unité de Biothérapies anti-Infectieuses et Immunité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1 place du Général Valérie André BP73, Brétigny-sur-Orge Cedex, France, **2** Centre National de Référence des Arbovirus, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Unité d'Arbovirologie HIA Laveran, Marseille, France, **3** Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, AFMB UMR 7257, Aix Marseille Université/CNRS – Case 932 163, Avenue de Luminy Marseille, France, **4** Unité des Virus Emergents (UVE: Aix-Marseille Univ – IRD 190 – Inserm 1207 – IHU Méditerranée Infection), Marseille, France, **5** Unité de Parasitologie et Entomologie, Département des Maladies Infectieuses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France, **6** Aix Marseille Université, IRD, AP-HM, SSA, UMR vecteurs – Infections Tropicales et Méditerranéennes (VITROME), IHU – Méditerranée Infection, Marseille, France, **7** Service de Santé des Armées, Centre d'Epidémiologie et de Santé Public des Armées, Marseille, France, **8** Aix Marseille Université, INSERM, SESSTIM, Science Economique & Sociales de la Santé & Traitement de l'Information Médicale, Marseille, France, **9** Unité Perception, Département Neurosciences et Sciences Cognitives, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 1 place du Général Valérie André BP73, Brétigny-sur-Orge, France

* cbadaut@gmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Denis J, Attoumani S, Gravier P, Tenebray B, Garnier A, Briolant S, et al. (2019) High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. *PLoS Negl Trop Dis* 13(9): e0007747. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747>

Editor: Isabel Rodriguez-Barraquer, University of California San Francisco, UNITED STATES

Received: December 4, 2018

Accepted: September 4, 2019

Published: September 20, 2019

Copyright: © 2019 Denis et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was partially supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme, under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548, as well as by the European Virus Archive goes global (EVAg) project, under Grant Agreement no. 653316, and partially funded by the Direction Générale de l'Armement and the Service de Santé des Armées, Biomedef PDH-2-

Abstract

Background

Zika virus (ZIKV) and Dengue virus (DENV) are often co-endemic. The high protein-sequence homology of *flaviviruses* renders IgG induced by and directed against them highly cross-reactive against their antigen(s), as observed on a large set of sera, leading to poorly reliable sero-diagnosis.

Methods

We selected Domain III of the ZIKV Envelope (ZEDIII) sequence, which is virus specific. This recombinant domain was expressed and purified for the specific detection of ZEDIII-induced IgG by ELISA from ZIKV-RT-PCR-positive, ZIKV-IgM-positive, *flavivirus*-positive but ZIKV-negative, or *flavivirus*-negative sera. We also assessed the reactivity of ZEDIII-specific human antibodies against EDIII of DENV serotype 4 (D4EDIII) as a specific control. Sera from ZEDIII-immunized mice were also tested.

Results

Cross-reactivity of IgG from 5,600 sera against total inactivated DENV or ZIKV was high (71.0% [69.1; 72.2]), whereas the specificity and sensitivity calculated using a representative cohort (242 sera) reached 90% [84.0; 95.8] and 92% [84.5; 99.5], respectively, using a

NRBC-2-B2-205 and PDH-2-NRBC-2-B-2111. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

ZEDIII-based ELISA. Moreover, purified human IgG against D2EDIII or D4EDIII did not bind to ZEDIII and we observed no D4EDIII reactivity with ZIKV-induced mouse polyclonal IgGs.

Conclusions

We developed a ZEDIII-based ELISA that can discriminate between past or current DENV and ZIKV infections, allowing the detection of a serological scar from other *flaviviruses*. This could be used to confirm exposure of pregnant women or to follow the spread of an endemic disease.

Author summary

The serological detection of Zika virus (ZIKV) is a challenge, as ZIKV infection generally leads to an immune response with a high level of cross reactivity against related viruses, such as Dengue virus. Although seroneutralization assays are the gold-standard to address specificity, a rapid and cost-effective detection assay with good specificity and sensitivity could be used for first-line screening. We used a large cohort to define a set of human reference sera to validate an ELISA based on a recombinant ZIKV antigen. The assay showed 90% specificity and 92% sensitivity, providing a good basis for the development of diagnostic assays. Characterization of both DENV-EDIII-purified human and murine IgG induced by ZIKV infection or ZEDIII, respectively, confirmed the good specificity of the antigen.

Introduction

Zika virus (ZIKV) was isolated in 1947 in the Zika forest in Uganda [1] and has been responsible for sporadic cases for several decades. Epidemics in Yap State, Micronesia (2007) [2], French Polynesia (2013) [3], and more recently the Americas 2015 [4], have dramatically changed its status. The association of ZIKV infection with Guillain-Barré syndrome [5] and severe outcomes during pregnancy, including microcephaly in fetuses and neonates [6, 7], have been brought to light during the last outbreaks. ZIKV can be sexually transmitted. This is uncommon for *flaviviruses*, which are arthropod-borne viruses (*arbovirus*) [8]. Infective ZIKV particles have also been found in breast milk but whether neonatal infection or perinatal transmission can occur is unclear [9]. Due to the ZIKV threat, the World Health Organization (WHO) declared a Public Health Emergency of International Concern on the 1st February 2016 [10].

According to WHO recommendations, the diagnosis is based on detection of the ZIKV genome by real-time reverse transcription PCR, serology, and neutralization assays, such as plaque-reduction neutralization tests (PRNT) [11]. However, induced antibodies can show high cross-reactivity between antigens of the same family, as *Flaviviruses* are phylogenetically very close. Moreover, Dengue virus (DENV) and ZIKV can co-circulate [12]. In addition, cross-seroneutralization of DENV and ZIKV, described recently [13], further complicates the development of relevant target antigens for reliable serological diagnosis. Several immunodiagnoses based on IgM detection have been developed [14, 15]. However, most cases are asymptomatic [16] and ZIKV-IgG detection is relevant for dating or confirming infections, especially those of pregnant women, retrospective diagnosis for evaluating transmission

intensity to decide on the use of a new prophylaxis, or confirming future ZIKV protection by vaccination.

Domain III of the ZIKV-envelope protein (EDIII) shares 29% amino-acid identity with DENV-EDIII and 90% of EDIII-antibodies (EDIII-Abs) elicited by ZIKV infection are virus specific [17]. ZIKV EDIII-Abs tested in ELISA do not bind to DENV-2 or West-Nile virus (WNV) -EDIII [18]. Studies in mice have shown that treatment with EDIII-Abs protect against ZIKV infection [19] by neutralizing the virus [18].

In this context, we produced a recombinant ZIKV-EDIII protein (ZEDIII) and assessed its recognition by IgG. We constructed four representative panels of reference sera, (1) ZIKV-RT-PCR-positive, (2) ZIKV-IgM-positive, (3) *flavivirus*-positive but ZIKV-negative, and (4) *flavivirus*-negative, from more than 5,000 sera serodiagnosed at the French National Reference Center for Arboviruses (NRC). The objective was to evaluate a ZEDIII-based ELISA for its specificity (ability to detect IgG raised after infection by ZIKV, but not other flaviviruses) and sensitivity (ability to detect ZIKV-specific IgG in the serum of a patient confirmed to be ZIKV-positive). We thus designed three experiments to evaluate: (1) the specificity and sensitivity of recognition by the IgG of cohort sera, (2) potential purified DENV-IgG cross-reactivity, and (3) the specificity of ZEDIII-induced IgG. The specificity of the assay represents its ability to not detect false-positive sera, that is positivity due to cross-reactive antibodies that are able to recognize a common antigen with the same affinity shared by various viruses.

Materials and methods

Ethics statement

As French National Reference center, all samples used in this study were sent to the laboratory for arboviruses diagnosis including the specificity of the antibodies response against different flaviviruses, as Zika virus. For this study, samples were analyzed anonymously. All samples sent in the laboratory are associated with a file with clinical data, travel, date of symptoms and also the consent to use the end of tube for technic development or comparison of diagnosis technics.

Human ethics

All sera were submitted to the French National Reference Center for arboviruses (NRC, Marseille) for routine diagnosis and stored at -20°C in an anonymized biobank before testing. No specific sampling dedicated to the study was performed. There were no legal or ethical restrictions for sample use. Associated documents contained the following information: date of birth, gender, date, nature of sampling, place of stay and return date, symptom onset date, clinical symptoms, and clinical diagnosis results.

Ethical approval of the ZIFAG cohort was given by the “Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée” corresponding to the “Etude descriptive prospective de la maladie à virus Zika au sein de la communauté de défense des Forces Armées en Guyane—ZIFAG” and was registered on 29 February 2016 as RCB: 2016-A00394-47. Written consent was obtained from all participants [20].

Clinical samples

A total of 5,600 sera from the NRC Arbovirus serum bank were serodiagnosed by ELISA using inactivated virus as antigen. This group was selected to follow antibody cross-reactivity between ZIKV and DENV. Eighty-one sera were not tested for the ZIKV-IgM response.

Table 1. Description of the sera for NRC, ZIKV, *Flavivirus*, and Negative groups.

Groups	NRC	ZIKV-RT-PCR-positive	ZIKV-IgM-positive	<i>Flavivirus</i>	Negative
Number, n	5600	43	50	99	50
Gender, n women (%), n men (%), n ND (%)	3624 (65%), 1867 (33%), 109 (2%)	12 (28%), 31 (72%)	42 (84%), 8 (16%)	61 (62%), 37 (37%), 1 (1%)	22 (44%), 28 (56%)
Age in years, median, IQR, (range), n ND (%)	35, 29–49, (0–91)	39, 32–43, (21–65)	36, 30–53, (9–80)	51, 36–65, (6–84)	46, 28–58, (2–78), 1 (2%)
DPSO, median, IQR, (range), n ND (%)	-	17, 15–22, (6–195)	26, 17–55, (6–139), 3 (6%)	20, 11–48, (8–99), 32 (32%)	17, 12–27, (7–175), 11 (22%)
ZIKV seroneutralizer, n (%), n ND (%)	-	-	35 (70%), 15 (30%)	-	-
Sera origins					
America, n (%)	3523 (62.9%)	43 (100%)	48 (96%)	-	22 (44%)
Pacific region, n (%)	353 (6.3%)	-	1 (2%)	-	2 (4%)
Asia, n (%)	494 (8.8%)	-	0 (0%)	-	9 (18%)
Africa, n (%)	407 (7.3%)	-	0 (0%)	-	13 (26%)
Europe, n (%)	745 (13.3%)	-	1 (2%)	-	4 (8%)
ND, n (%)	78 (1.4%)	-	0 (0%)	-	0 (0%)
Guadeloupe, n (%)	-	-	-	51 (52%)	-
Martinique, n (%)	-	-	-	38 (38%)	-
Saint-Martin, n (%)	-	-	-	10 (10%)	-
DENV/ZIKV Spearman r (p < 0.0001) for IgG	0.7986	-	0.8417	0.7811	NS

Abbreviations: NRC, French National Reference Center for arboviruses; ND, not documented; IQR, inter-quartile range; DPSO, day-post symptom onset; DENV, Dengue virus; NS, not significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t001>

A set of sera was selected (n = 242) from the 5,600 of the NRC Arbovirus serum bank, as well as a set from the ZIFAG cohort, and divided into four groups based on their genome detection, reaction against inactivated arboviruses, and epidemiological data (Table 1, SD1 Fig). The “ZIKV-RT-PCR-positive” group, from the ZIFAG one-year clinical follow-up cohort, is composed of 43 sera collected in French Guyana during the 2016 ZIKV outbreak [20, 21]. The ZIKV genome was detected by RT-PCR during the acute phase and tested sera were obtained during convalescence: 6 to 195 days post symptoms onset (DPSO). Eighty-four percent of this group (n = 36) was sampled during the first month post symptoms onset: two sera were obtained less than 10 days DPSO and 34 between 13 and 25 DPSO. The other sera (n = 7) were obtained between 35 and 195 DPSO [21]. The “ZIKV-IgM-positive” group was composed of 50 randomly selected sera, collected mainly from the Caribbean Islands or another DENV-endemic area during the 2015–2016 ZIKV epidemic (total n = 241), based on the following criteria: ZIKV-IgM-positive, DENV-IgM negative, and ZIKV-IgG positive, all tested sera neutralizing ZIKV in PRNT assays. “*Flavivirus*” sera (n = 99) group was selected to be *flavivirus*-positive but not ZIKV-positive (total n = 797). All were *flavivirus*-IgG positive and sampled between 2013 and 2014 in Guadeloupe, Martinique, or Saint Martin, DENV-endemic areas, where and when ZIKV was not circulating, assuming that these patients were not ZIKV infected. The “Negative” sera group was composed of 50 negative sera that were both IgM- and IgG-negative for DENV, WNV, Chikungunya virus, Encephalitis St Louis virus, ZIKV, Toscana virus, and Rift Valley fever virus. The ZIKV-IgM-positive, *flavivirus* and negative groups were representative of the entire parent groups in terms of their mean age and immune responses. We determined the sensitivity of the ZEDIII-based ELISA with the

ZIKV-RT-PCR-positive group and compared it to that of the ZIKV-IgM-positive group, and the specificity to that of the *flavivirus*-positive group. The serology of the samples was tested upon their arrival to the arbovirus NRC and then stored at -20°C. The antibodies were stable over time and no difference in response was observed several months or years after freezing.

EDIII production and purification

Sequences of the Asian ZIKV strain from the French Polynesia outbreak of 2013, DENV2, the most frequently detected serotype by the NRC for Arbovirus, and DENV4, the DENV strain phylogenetically closest to ZIKV (accession numbers AHZ13508, P09866, and M29095, respectively), were selected for EDIII production using the structure of the ZIKV envelope protein (PDB 5JHM). The ZEDIII, D2EDIII, and D4EDIII coding sequences, optimized for production in *E. coli*, were synthesized in fusion with a His-tag coding sequence at their 5' end by GenScript. The sequences were then cloned into pET-24a or pET-19b plasmids (Novagen). The recombinant proteins were produced in *E. coli* T7 Iq Express (New England Biolabs) and purified under denaturing conditions prior to *in vitro* refolding according to a protocol described previously [22]. The purity, conformation, and homogeneity of folding of the protein were controlled by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light-scattering analysis (SEC-MALS) and Coomassie blue-stained SDS PAGE gels.

IgG purification from EDIII-positive sera using recombinant ZEDIII, D2EDIII, or D4EDIII

IgG were purified from pools of 20 sera from the ZIKV-positive group against ZEDIII, and 20 positive sera from the *flavivirus*-positive but ZIKV-negative groups against D2EDIII or D4EDIII (25 µL per sera for a total of 500 µL per pool). Antibody purification was carried out in two steps, first on a protein-G column and then on a column with immobilized recombinant EDIII. For the immobilization of EDIII, 1 mg of recombinant ZEDIII, D2EDIII, or D4EDIII in 2.5 mL phosphate-buffered saline (PBS) was covalently bound to an NHS-activated column following the manufacturer's protocol (GE Healthcare). Four milligrams of protein-G-purified antibodies from EDIII positive sera in 4 mL were then loaded onto the EDIII-coupled columns. After washes with PBS, EDIII-specific antibodies were eluted from the column with 1 mL 0.1 M glycine (pH 2.7) and neutralized with 100 µL 1 M Tris (pH 9).

Virus production, inactivation, and purification

Vero cells were inoculated with 0.01 MOI ZIKV (African ZIKV strain, accession number ArB41644) or DENV2 (Martinique DENV2 98–703 strain of 1998, accession number AF208496) and grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) complemented with 2% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) at 37°C in 5% CO₂ for 3.5 (ZIKV) or 7 (DENV2) days. The time of growth depended on the virus. Culture supernatants were centrifuged, and viral particles precipitated with polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) and NaCl. The precipitates were washed and resuspended in PBS/Hepes solution. This viral solution was inactivated with beta-propiolactone.

Mouse immunization

Six-to-eight-week old female AG129 mice, weighing approximately 20 g at the start of the study, were subcutaneously injected with 10 µg ZEDIII in 20 µL PBS on day 0 and received a boost on days 15 and 30. Blood was collected on day 46 via the retro-orbital route.

All procedures were in accordance with the guidelines set by the Noble Life Sciences (NLS) Animal Care and Use Committee. Noble is fully accredited by the Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC). Veterinary care for all lab animals was in accordance with the Public Health Service Policy, U.S. Dept. of Agriculture (USDA) and AAALAC International requirements. All mice were bred at B&K Universal Laboratories under specific pathogen-free conditions. All experiments were carried out at Integrated BioTherapeutics, Inc.

ELISA responses of sera and purified IgG to EDIII

96-well plates (Maxisorp, NUNC-Immuno Plate) were coated with 200 ng/well of recombinant protein diluted in PBS and incubated over night at 4°C. After removing antigen, wells were blocked with blocking buffer (3% milk in PBS) for 1 h at 25°C. After two washing steps with washing buffer (1% Tween 20 in PBS), they were incubated with 100 µL diluted human serum samples (1:500), diluted purified human IgG (0.15 or 0.06 µg/mL), or sera from vaccinated mice diluted (1:25) in dilution buffer (3% milk and 0.1% Tween 20 in PBS), then incubated 1 h at 25°C. After four washing steps, the plates were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG (1:10,000) (Jackson Laboratories, Immuno Research) or horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:40,000) (Sigma-Aldrich) diluted in dilution buffer for 1 h at 25°C. After four washing steps, TMB (KPL, TMB micro-well Peroxidase Substrate System) was added and the reaction stopped after 5 min with 50 µL 0.25M H₂SO₄ per well. The optical density (OD) was read at 450 nm and the final values, OD ratio (ODr), obtained by dividing the average OD of duplicate wells from that of the corresponding blank non-coated wells. The threshold of positivity was calculated following the equation: $m + 3\sigma$ (m = mean, σ = standard deviation, α (error) = 1%) on the ODr of the negative-sera group. Self-recognition of human purified IgG ODr was normalized to 100% for each EDIII.

ELISA responses of sera to inactivated viruses

96-well plates (Maxisorp, NUNC-Immuno Plate) were coated with inactivated viruses diluted (1:200) in PBS and incubated over night at 4°C. After removing antigen, wells were blocked with blocking buffer (3% milk and 1% sodium azide in PBS) for 1 h at room temperature (RT) in the dark. After two washing steps with washing buffer (0.05% Tween 20 in PBS), they were incubated with 100 µL human serum samples diluted (1:500) in dilution buffer (3% milk, 0.05% Tween 20, and 1% sodium azide in PBS), then incubated 1 h at 41°C. After four washing steps, the wells were incubated with human secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG (1:10 000) (Jackson Laboratories, Immuno Research), diluted in dilution buffer and incubated 1 h at 41°C. After four washing steps, TMB (KPL, TMB microwell Peroxidase Substrate System) was added and the reaction stopped after 5 min with 50 µL 0.25M H₂SO₄ per well. The optical density (OD) was read at 450 nm and final values were obtained by dividing the average OD of duplicate wells from that of the corresponding blank wells coated with negative antigen. The threshold of positivity was fixed to an ODr of 3.

ELISA responses of sera to NS1 antigen (Euroimmun kit)

IgG responses of human sera samples were tested against NS1 (Euroimmun kit) following the manufacturer's protocol (Euroimmun). Ambiguous results were considered to be negative.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Prism 6 (GraphPad). IgM and IgG responses to DENV and ZIKV were correlated and R-values determined by the Spearman rank correlation test with $n = 5,600$.

The IgG response data of the selected groups (ZIKV-RT-PCR-positive, $n = 43$; ZIKV-IgM-positive, $n = 50$; *Flavivirus*, $n = 99$; Negative, $n = 50$) were plotted showing the median, 25th, and 75th percentiles. The non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's correction was used to identify the differences between the medians of the IgG responses with two-tailed and $\alpha = 0.01$ for each test. The two-tailed Z-test with $\alpha = 0.05$ was used to compare the difference in sensitivity of the ZEDIII- and NS1-based ELISAs according to the group or cohort used. The overlap of the IC 95% was assessed to compare the difference of misdiagnoses between the ZEDIII- and NS1-based ELISAs. The non-parametric Wilcoxon rank-sum test was used to compare the difference of the mouse IgG responses to ZEDIII or D4EDIII.

The study was performed in compliance with the STAndards for Reporting of Diagnostic accuracy (STARD) statement [23].

Results

Cross-reactivity of IgM and IgG between Dengue, West-Nile, and Zika Viruses

IgM cross-reactivity [95% Confidence Interval] between related *flaviviruses* (Fig 1A, Table 2) represented 23.8% [20.4; 27.2] of the sera ($n = 121$) that reacted against at least one virus ($n = 606$). In contrast, IgG cross-reactivity [95% Confidence Interval] (Fig 1B) represented 71.0% [69.1; 72.2] of the sera ($n = 1,485$) that reacted against at least one virus ($n = 2,091$). This

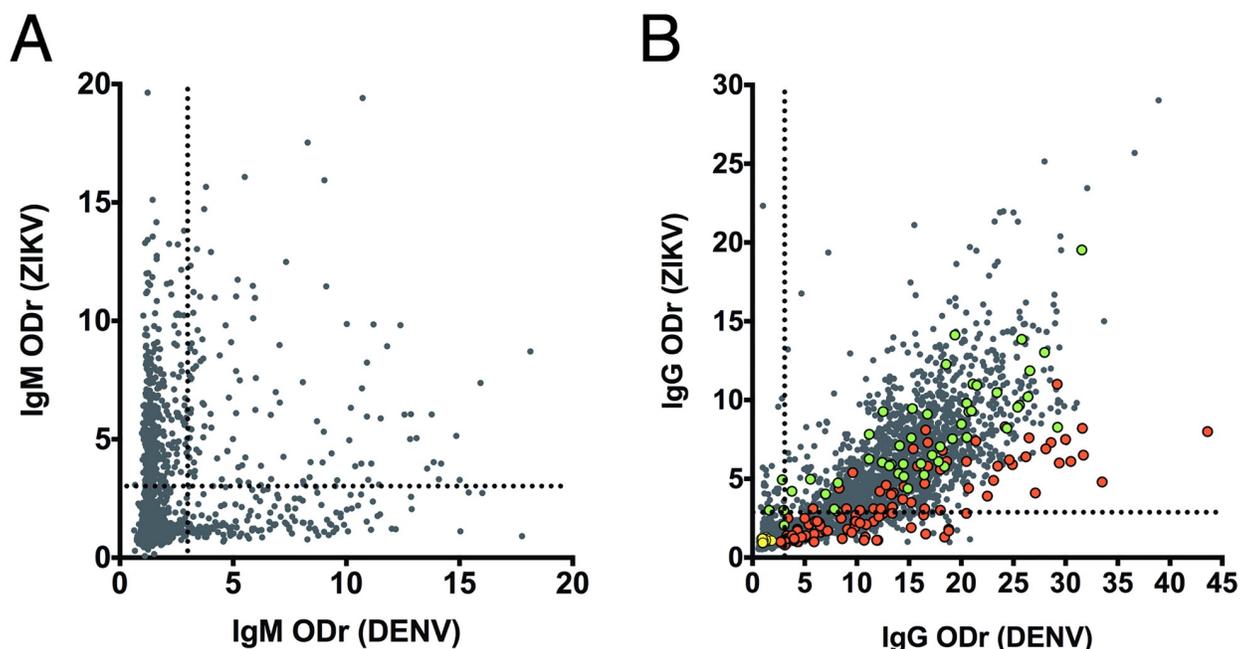


Fig 1. Reactivity of sera against inactivated Dengue and Zika viruses by ELISA. IgM (A) and IgG (B) Optical Density ratio (ODr = OD (target) / OD (noise)) against DENV (abscissa) and ZIKV (ordinate) obtained by ELISA. Values are positive if ODr is ≥ 3 (dotted line) in an ELISA assay using total inactivated virus as target. The IgM group ($n = 5,519$) is included in the IgG group ($n = 5,600$). Three groups were assembled: ZIKV-IgM-positive (green, $n = 50$), *flavivirus* (red, $n = 99$), and negative (yellow, $n = 50$) groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.g001>

Table 2. Percentage of sera that recognize, or not, DENV and ZIKV.

n, % (%)	IgM (n = 5,519)		IgG (n = 5,600)	
	DENV-	DENV+	DENV-	DENV+
ZIKV+	341, 6.2% (56.3%)	121, 2.6% (23.8%)	25, 0.4% (1.2%)	1,485, 26.5% (71.0%)
ZIKV-	4,913, 89.0%	144, 2.2% (20%)	3,509, 62.7%	581, 10.4% (27.8%)

Abbreviations: ZIKV, Zika virus; DENV, Dengue virus.

n is the number of sera recognizing (+) or not (-) DENV and/or ZIKV. The percentage of sera (IgM or IgG) recognizing at least one of the viruses is shown in the brackets.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t002>

cross-reactivity was evaluated by calculating the Spearman r correlation ($p < 0.0001$; $r(\text{IgM}) = 0.4191$, $r(\text{IgG}) = 0.7986$). The r value for IgG indicates a strong correlation between the recognition of ZIKV and DENV (Table 1). We obtained similar results concerning the cross-reactivity of IgM (11.6% [8.3; 14.9]; $n = 42$) and IgG (79.7% [77.4; 82]; $n = 971$) against WNV and ZIKV (Table 3).

IgG from the sera of the ZIKV-positive group and the flavivirus-positive but ZIKV-negative group (colored dots, Fig 1B) cross reacted with DENV and ZIKV similarly to all 5,600 sera: 68.7% versus 71% of IgG, showing that these two panels are representative of the 5,600 sera (Table 1).

Domain III sequence selection and variability

The ZEDIII amino-acid sequence shares 46.3% and 47.2% identity and 64.8% homology with the amino-acid sequences of D2EDIII and D4EDIII, respectively (Fig 2). The DENV2 and DENV4 EDIII amino-acid sequences share 61% identity and 78.1% homology. The purified EDIIIs analyzed by SEC-MALS and Coomassie blue-stained SDS Page gels showed the elution of a pure protein in a single and symmetric peak with an average molecular weight of 14.5 kDa and a polydispersity of 1.01 (Fig 3A and 3B). The presence and importance of the conformational epitopes for ZEDIII recognition was highlighted by the loss of recognition of ZIKV-

Table 3. Percentage of sera that recognize, or not, WNV and ZIKV.

n, % (%)	IgM (n = 3,360)		IgG (n = 3,441)	
	WNV-	WNV+	WNV-	WNV+
ZIKV+	241, 7.2% (67.0%)	42, 1.2% (11.6%)	19, 0.5% (1.5%)	971, 28.2% (79.7%)
ZIKV-	3,000, 89.3%	77, 2.3% (21.4%)	2,222, 64.6%	229, 6.7% (18.8%)

Abbreviations: WNV, West-Nile Virus; ZIKV, Zika virus.

n is the number of sera recognizing (+) or not (-) WNV and/or ZIKV. The percentage of sera (IgM or IgG) recognizing at least one of the viruses is shown in the brackets.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t003>



Fig 2. Similarity of domain III of the envelope protein (EDIII). EDIII sequences are aligned. Green: 100% similar; khaki: 80 to 100% similar; orange: 60 to 80% similar; grey: less than 60% similar. Numbering is relative to that of ZEDIII.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.g002>

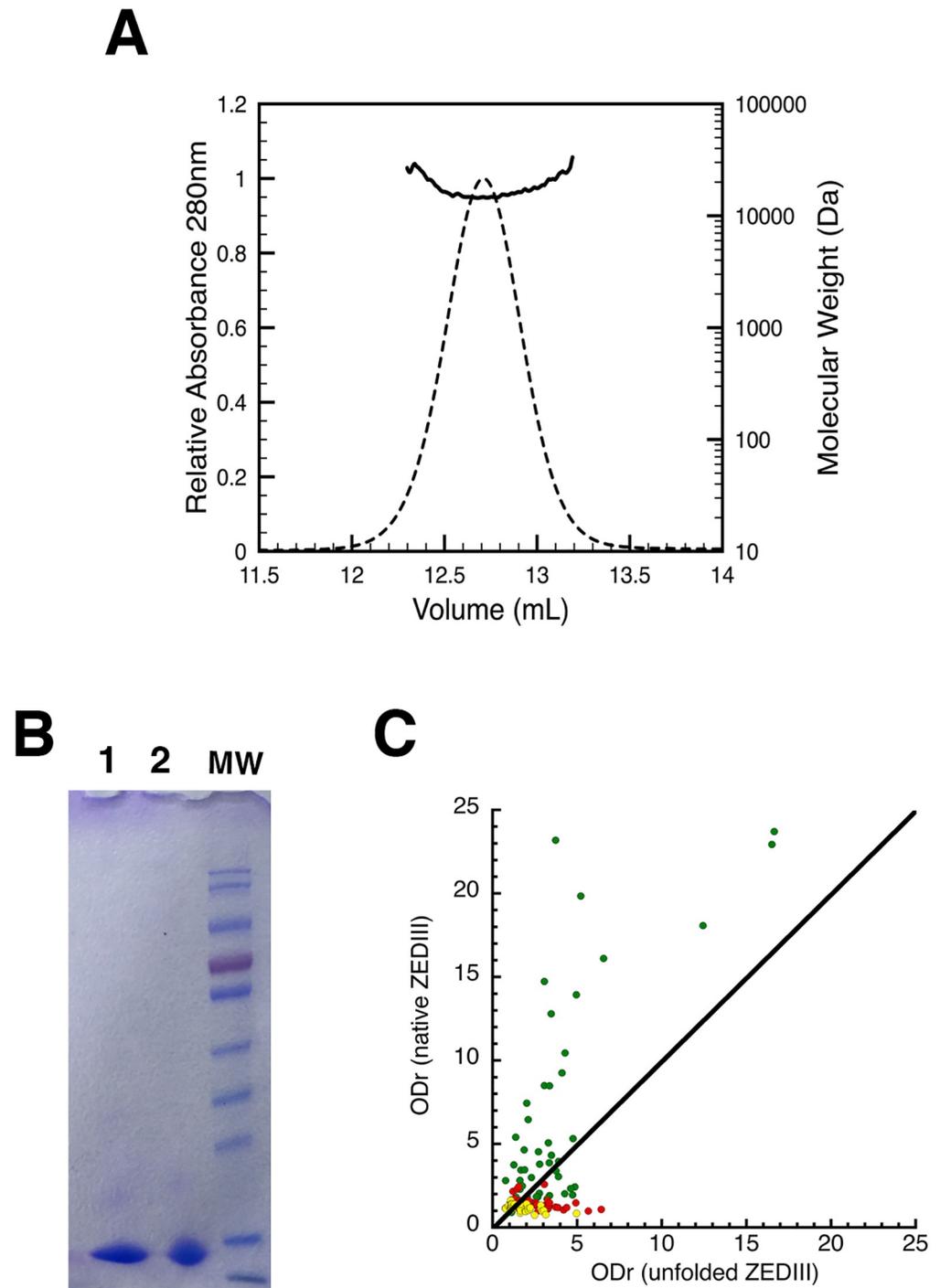


Fig 3. Characterization of refolded ZEDIII. (A) Raw data of the analytical size-exclusion chromatography of ZEDIII followed by MALS/UV/refractometry. The abscissa and ordinate axes correspond to the elution volume and the molecular weight (Da) obtained by MALS, respectively. The OD_{280nm} is represented by the non-continuous black trace and the molecular weight by the continuous black trace. The value of the measured molar mass (14.5 kDa) at the volume corresponding to the top of the peak is reported. The population of ZEDIII with a molar mass of 14.5 kDa is more than 95%. (B) Purity of ZEDIII after refolding and purification analyzed on an SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue. MW: molecular weight (in kDa). Lane 1: ZEDIII under reducing conditions (DTT); Lane 2: ZEDIII under non-reducing conditions. (C) Recognition of linear and conformational epitopes by ZIKV-IgM-positive (green, n = 50), flavivirus (red, n = 50), and negative (yellow, n = 50) groups by ELISA.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.g003>

positive sera against chemically and thermally denatured ZEDIII and a gain of recognition of flavivirus-positive but non ZIKV-positive or negative sera (Fig 3C).

ELISA responses of IgG against viral or recombinant protein targets

We investigated the reactivity of IgG of the four sera groups against inactivated DENV, ZIKV, ZEDIII, and NS1 proteins (Fig 4 and [21]) by ELISA. The ZIKV-RT-PCR-positive, ZIKV-IgM-positive, and *flavivirus* groups recognized DENV with medians of 14.4, 16.6, and 12.3 ODr, respectively, with no statistical difference ($K = 5.02$, $p = 0.0811$), whereas no negative serum samples recognized DENV (median ODr of 1.1). The ZIKV-RT-PCR-positive, ZIKV-IgM-positive, and *flavivirus* groups recognized ZIKV (median ODr of 8.6, 7.3, and 2.8, respectively). The levels of recognition between the ZIKV-RT-PCR-positive or ZIKV-IgM-positive groups and *flavivirus* group were statistically different (Mean rank diff. = 89.61, $p < 0.0001$; Mean rank diff. = 64.98, $p < 0.0001$) but similar for the ZIKV-RT-PCR-positive and ZIKV-IgM-positive groups (Mean rank diff. = 24.63, $p = 0.0993$). The negative group did not recognize ZIKV (median ODr of 1.1). The difference between the ability of the ZIKV-RT-PCR-positive and *flavivirus* groups (median ODr of 2.2 and 1.1, respectively) or ZIKV-IgM-positive and *flavivirus* groups (median ODr of 3.6 and 1.1, respectively) to recognize ZEDIII was highly significant (Mean rank diff. = 103.3, $p < 0.0001$, Mean rank diff. = 123.2, $p < 0.0001$, respectively), whereas there was no statistical difference between the *flavivirus* and negative sera (median ODr of 1.1 and 1.2; respectively, Mean rank diff. = -13.75, $p > 0.9999$) or the ZIKV-RT-PCR-positive and ZIKV-IgM-positive sera (median ODr of 2.2 [1.7; 4.0] and 3.6 [2.0; 8.5]; respectively, Mean rank diff. = -19.82, $p > 0.9999$). The median of the OD obtained for the ZIKV-RT-PCR-positive and ZIKV-IgM-positive sera against ZEDIII was 0.12 (IQR [0.09; 0.24] min = 0.06; max = 1.96) and 0.29 (IQR [0.17; 0.64] min = 0.07; max = 2.10) respectively, whereas the median OD obtained against the blank was 0.05 (IQR [0.05; 0.06] min = 0.05; max = 0.08) and 0.08 ([0.07; 0.10], min = 0.05, max = 0.23), respectively.

With a calculated positive threshold based on the negative-group values ($m + 3\sigma$) of 1.54 ($m = 1.17$ and $\sigma = 0.13$), and tolerating a 1% error rate, one serum (2%) of the negative sera was positive against ZEDIII and 49 (98%) were negative. The smallest OD value considered to be positive with this positive threshold was 0.085, with a blank of 0.055, and the highest OD value was 2.12. The sensitivity was calculated as the number of positive sera from the ZIKV-RT-PCR-positive or ZIKV-IgM-positive groups, of which 39 of 43 (90.7%) or 46 of 50 (92.0%), respectively, were positive against the ZEDIII-based assay (Table 4) and four (9.3% or 8.0%, respectively) did not react. The sensitivity [95% confidence interval] was thus 90.7% [82.0; 99.4] or 92.0% [84.5; 99.5], respectively. There was no difference in sensitivity between these two groups (Z-test, $p = 0.2219$). The specificity was calculated as the negative sera in the *flavivirus* group ($n = 99$) or in both the *flavivirus* group plus the negative group ($n = 149$). Ten sera (10.1%) of the *flavivirus* group or 11 sera (7.4%) of the *flavivirus* group plus the negative group were positive against ZEDIII and 89 or 138 were negative (89.9% and 92.6%, respectively). Thus, the specificity [95% confidence interval] was 89.9% [84.0; 95.8] or 92.6% [84.4; 100]. These groups were also tested against NS1 protein using the Euroimmun kit. We determined a specificity of 83.8% [76.8; 91.2] with the *flavivirus* group and up to 89.3% [84.3; 94.3] with the *flavivirus* group plus the negative group and a sensitivity of 88.4% [78.8; 98.0] with the ZIKV-RT-PCR-positive group and 96.0% [90.6; 100.0] with the ZIKV-IgM-positive group (Table 4). There was no statistical difference in sensitivity between these two groups (Z-test, $p = 1.3535$). The specificity obtained with the NRC ELISA against ZIKV was 46.5% [36.7; 56.3]; the sensitivity was 100% with the ZIKV-RT-PCR-positive group and 96.0% [90.6; 100] with ZIKV-IgM-positive group.

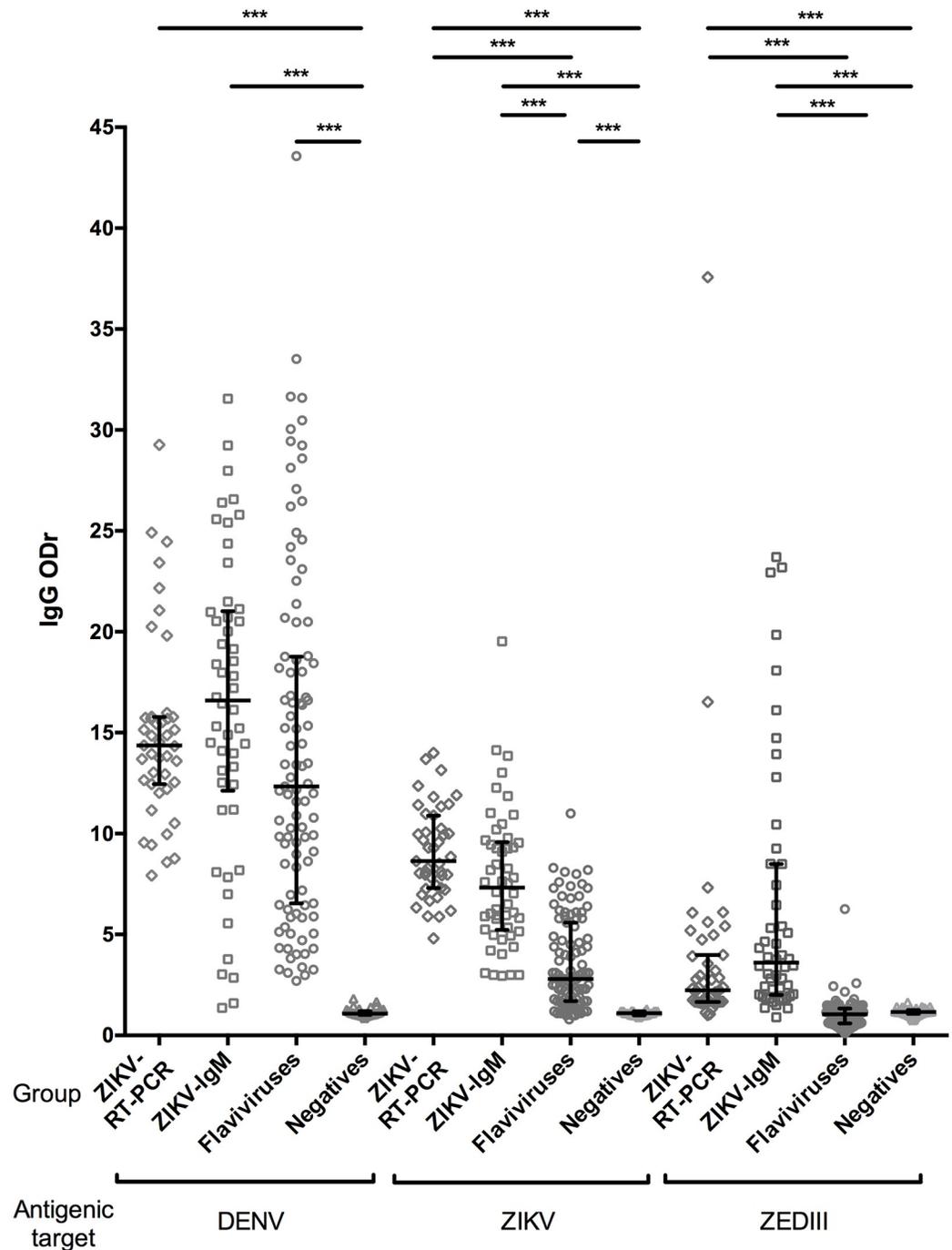


Fig 4. Detection of inactivated ZIKV or DENV or ZDIII antigens by the four reference panels. An ELISA experiment with 242 sera selected for their status (ZIKV-RT-PCR-positive (n = 43), ZIKV-IgM-positive (n = 50), *flavivirus* (n = 99), or negative (n = 50)) was performed against ZIKV, DENV, or ZEDIII antigens in duplicate. The top, bottom, and middle lines correspond to the 75th, 25th, and 50th (median) percentiles, respectively. ***K, p < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.g004>

We compared the reliability of the ZEDIII- and NS1-based ELISA by calculating the positive predictive value (PPV), the false discovery rate (FDR), the negative predictive value (NPV), and the false omission rate (FOR) within a 'hypothetical population' with a given prevalence of 33.5% (50/149), composed of ZIKV-IgM-positive (sensitivity identical to that of the

Table 4. Number of positive results obtained by ELISA against DENV, ZIKV, ZEDIII, and NS1 by the ZIKV-RT-PCR-positive, ZIKV-IgM-positive, *Flavivirus*, and negative groups.

Antigenic target	DENV	ZIKV	ZEDIII	ZIKV NS1 (Euroimmun kit)
ZIKV-RT-PCR-positive sera (n = 43), number of positive responses, n (%) [95% confidence interval]	43 (100%)	43 (100%)	39 (90.7%) [82.0; 99.4]	38 (88.4%) [78.8; 98.0]
ZIKV-IgM positive sera (n = 50), number of positive responses, n (%) [95% confidence interval]	48 (96%) [90.6; 100]	48 (96%) [90.6; 100]	46 (92%) [84.5; 99.5]	48 (96%) [90.6; 100]
<i>Flavivirus</i> sera (n = 99), number of positive responses, n (%) [95% confidence interval]	99 (100%)	53 (53%) [43.2; 62.8]	10 (10%) [4.1; 15.9]	16 (16%) [8.8; 23.2]
Negative sera (n = 50), number of positive responses, n (%) [95% confidence interval]	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%) [0; 5.9]	0 (0%)

Abbreviations: DENV, Dengue virus; ZIKV, Zika virus; ZEDIII, ZIKV envelope protein domain III, NS1, non-structural protein 1.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t004>

ZIKV-RT-PCR-positive group) and *flavivirus* groups (n = 149; Table 5). The likelihood of being positive when detected as positive (PPV) was 82.1% [72.1; 92.1] with the ZEDIII- and 75.0% [64.4; 85.6] with the NS1-based ELISA, whereas the likelihood of being negative when detected as negative (NPV) was 95.7% [91.6; 99.8] and 97.6% [94.3; 100] with the ZEDIII- and NS1-based assays, respectively. The likelihood of being positive when not detected (FOR) was 4.3% [0.2; 8.4] and 2.4% [0; 5.7] with the ZEDIII- and NS1-based ELISAs, respectively, and the likelihood of being negative when detected as positive (FDR) was 17.9% [7.9; 27.9] and 25.0% [14.4; 35.6] with the ZEDIII- and NS1-based ELISAs, respectively.

Evaluation of the avidity and cross-reactivity of ZEDIII binding IgG

We further characterized the lack of cross reactivity of anti-EDIII IgG of the three sub-groups selected from the ZIKV-positive and *flavivirus*-positive panels (Table 6). IgG purified against D2EDIII and D4EDIII cross-reacted with D4EDIII and D2EDIII (39.7 ± 4.2% and 47.0 ± 4.2% respectively, Fig 5A). Conversely, D2EDIII and D4EDIII-purified IgG did not recognize ZEDIII. ZEDIII-purified IgG recognized ZEDIII well (ODr = 15.9).

We next addressed the immune response induced by the recombinant ZEDIII. The median ODr of the sera obtained after the immunization of eight mice by ZEDIII was 2.25 and 1.02 against ZEDIII and D4EDIII, respectively. The difference between the ability of the sera to recognize the two recombinant proteins was significant (W = 36, p = 0.0078). None of the five ZEDIII-positive sera from mice (n = 8) recognized D4EDIII (Fig 5B), with the sequence closest to that of ZEDIII (Fig 2).

Table 5. Comparison of the positive and negative predictive values between the ZEDIII- and NS1-based-ELISAs in a hypothetical population with 33.5% prevalence.

Antigenic target	ZEDIII	NS1
PPV, %, [95% CI]	46/56, 82.1, [72.1; 92.1]	48/64, 75.0, [64.4; 85.6]
FOR, %, [95% CI]	4/93, 4.3, [0.2; 8.4]	2/85, 2.4, [0; 5.7]
NPV, %, [95% CI]	89/93, 95.7, [91.6; 99.8]	83/85, 97.6, [94.3; 100]
FDR, %, [95% CI]	10/56, 17.9, [7.9; 27.9]	16/64, 25.0, [14.4; 35.6]
P misdiagnosis, %, [95% CI]	14/149, 9.4, [4.7; 14.1]	18/149, 12.1, [6.9; 17.3]

Abbreviations: ZEDIII, ZIKV envelope protein domain III; NS1, non-structural protein 1; PPV, positive predictive value; FOR, false omission rate; NPV, negative predictive value; FDR, false discovery rate; CI, confidence interval

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t005>

Table 6. Description of the sera origin used for the specific EDIII-IgG purification.

Groups purified on:	ZEDIII (ZIKV pos.)	D2EDIII (Flavivirus pos.)	D4EDIII (Flavivirus pos.)
Number, n	20	20	20
Gender, n women (%), n men (%), n ND (%)	16 (80%), 4 (20%)	12 (60%), 8 (40%)	15 (75%), 5 (25%)
Age in years, median, IQR, (range), n ND (%)	33, 30–42, (21–70)	50, 31–54, (6–75)	52, 33–67, (17–73), 1 (5%)
DPSO, median, IQR, (range), n ND (%)	29, 19–66, (12–139), 2 (10%)	45, 21–62, (8–90), 8 (40%)	32, 9–75, (8–99), 9 (45%)
n ZIKV sero-neutralizer (%), n ND (%)	12 (60%), 8 (40%)	-	-
n Positive recognition of ZEDIII (%), (ODr range)	20 (100%), (3.97–23.71)	0 (0%), (0.30–1.49)	0 (0%), (0.41–1.48)
n Positive recognition of D2EDIII (%), (ODr range)	8 (40%), (0.72–6.27)	20 (100%), (2.16–8.57)	9 (45%), (0.60–13.11)
n Positive recognition of D4EDIII (%), (ODr range)	14 (70%), (0.81–8.92)	10 (50%), (1.05–5.77)	20 (100%), (3.10–23.56)
Sera origins			
West Indies, n (%)	1 (5%)	-	-
Guadeloupe, n (%)	2 (10%)	9 (45%)	9 (45%)
Martinique, n (%)	13 (65%)	5 (25%)	11 (55%)
New Caledonia, n (%)	1 (5%)	-	-
Saint-Martin, n (%)	2 (10%)	6 (30%)	-
Venezuela, n (%)	1 (5%)	-	-

Abbreviations: ZEDIII, Zika virus envelope protein domain III; D2EDIII, Dengue virus serotype 2 envelope protein domain III; D4EDIII, Dengue virus serotype 4 envelope protein domain III; ND, not documented; DPSO, day post-symptoms onset; IQR, inter-quartile range; ODr, optical density ratio.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.t006>

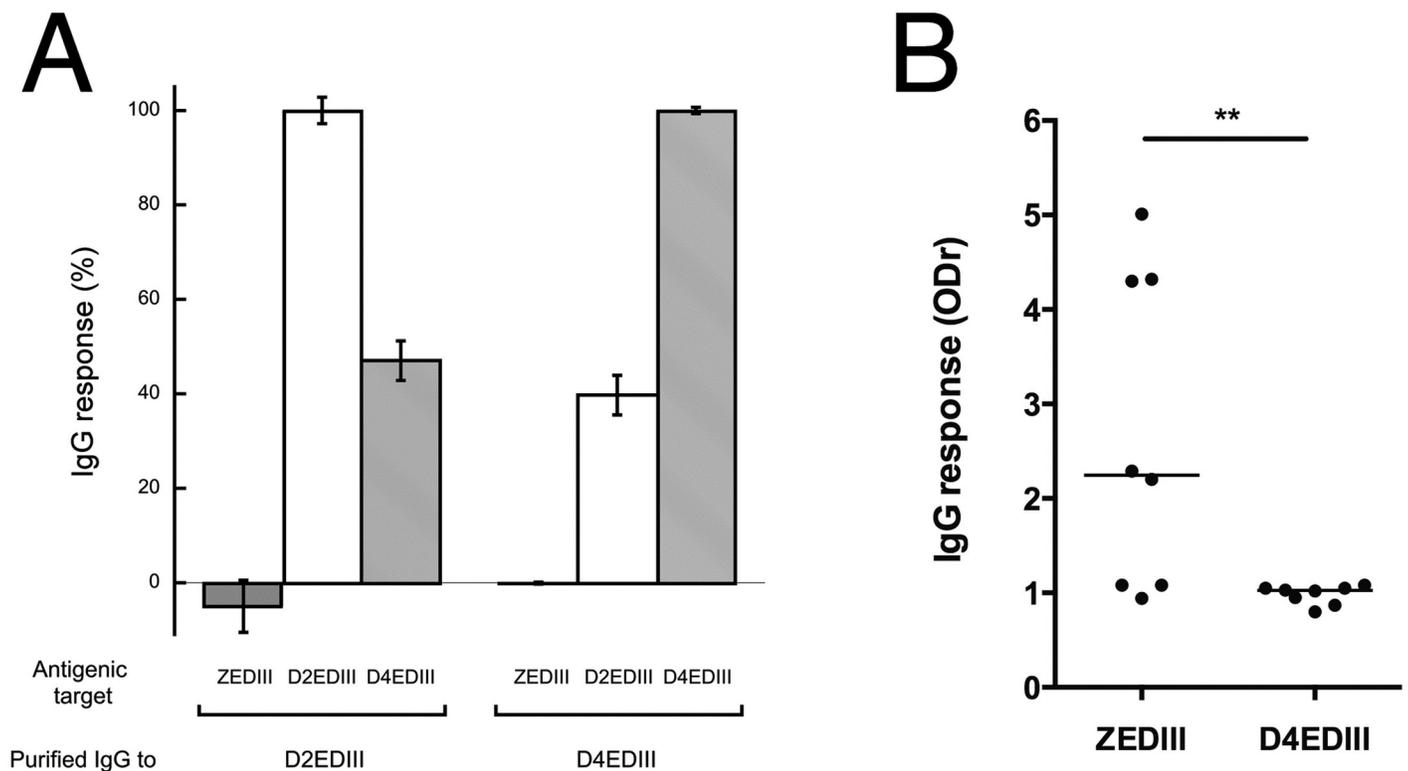


Fig 5. Cross-reactivity and specificity of IgG directed against ZEDIII. (A) Cross-reactivity of purified anti-EDIII IgG. Purified IgG against D2EDIII or D4EDIII were tested by ELISA. The recognition of ZEDIII is shown in dark grey, D2EDIII in white, and D4EDIII in light grey. Self-recognition is normalized to 100%. (B) The IgG response to ZEDIII and D4EDIII of immunized mice was measured by ELISA. The median is shown for both ZEDIII and D4EDIII. **W = 36, p = 0.0078.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007747.g005>

Discussion

To date, no broad antibody cross-reactivity study has been performed for *flavivirus* with a particular emphasis on ZIKV, despite the often high co-endemicity of flaviviruses. Our study included more than 5,000 samples, providing sufficient power to observe statistically significant cross-reactivity results and select sera for the design of reference groups of patients. First, we observed low IgM cross-reactivity and high IgG cross reactivity against inactivated ZIKV, DENV, and WNV. This is generally observed with *flavivirus*-positive human sera, resulting in low diagnostic reliability of IgG-based assays [14, 24]. The use of peptides or recombinant proteins can partially improve the specificity of IgG-based diagnostic assays. Indeed, ZEDIII is specifically recognized with high sensitivity by anti-ZIKV IgG and can distinguish between DENV and ZIKV in late phase or post-infection. IgM detection shows relatively good specificity (only 23.8% cross-reactivity) permitting the determination of the infecting *flavivirus*, as already shown [25]. However, the IgM response does not persist. Thus, we studied ZEDIII recognition by IgGs, the most persistent antibodies.

We divided the set of sera into four groups based on various characteristics that allowed us to confirm their membership in each group. First, we determined the sensitivity of our assay using the reference group, the ZIKV-RT-PCR-positive group, which recognized the ZEDIII domain with the same sensitivity (90.7% [82.0; 99.4]) as the selected ZIKV-IgM-positive group (92.0% [84.5; 99.5]), allowing us to validate the ZIKV-IgM-positive group as a ZIKV-positive group. Thus, IgM that recognized only the total inactivated ZIKV, but not DENV (56.3% of ZIKV-infected patients), were induced by ZIKV, allowing the diagnosis of a recent ZIKV infection. Second, IgG from the sera of “*flavivirus*” patients, selected from 2013 to 2014 in Guadeloupe and Martinique, recognized all *flaviviruses* where and when ZIKV was likely not circulating. The large size of our group and the rational to select the sera allowed us to assemble relevant panels of samples suitable to support a robust and accurate study of ZIKV IgG detection using recombinant ZEDIII antigen.

The specificity for ZEDIII reached 89.9% and sensitivity 92.0%, whereas IgG presented cross-reactivity against total inactivated viruses (71% of IgG recognized both DENV and ZIKV). This makes recombinant EDIII one of the most robust tools for diagnosis [14, 24]. Of note, most of the 10 false-positive sera from the *flavivirus* groups gave a value close to the positive threshold. The OD_r of only one serum sample was 6.26. Based on denaturation experiments (Fig 3), correct conformational folding of the EDIII protein is required for specific recognition. Indeed, chemical and heat denaturation of the protein led to the loss of recognition in ELISA assays, likely due to the loss of conformational epitopes, thereby decreasing specificity.

Given the high DENV seroprevalence observed in the area from which the ZIKV-IgM-positive group (mean age = 40 years) originated (93.5% of the Caribbean island population (mean age = 38 years), [26]) it is likely that they were infected with DENV prior to ZIKV infection, although we have no way of knowing whether the antibodies that recognized ZEDIII were actually induced by DENV. We thus purified IgG against immobilized EDIII domains to discriminate between IgG induced by and directed against ZIKV from that induced by DENV but cross-reacting to both ZIKV and DENV. No IgG from the selected pools purified against D2EDIII or D4EDIII recognized ZEDIII. Such a lack of cross-reactivity underscores the high specificity of the immune response against this antigenic domain. It is likely that the anti-ZEDIII antibodies were induced by ZIKV infection and not DENV infection, as we were unable to observe recognition of ZEDIII by the sera of patients who had never been infected by ZIKV. Thus, the high sensitivity obtained with our assay is due to ZIKV-induced IgG recognition and not potential cross-reactive IgG. The binding experiments developed to validate the

low cross-reactivity in the ZEDIII-based ELISA showed that IgG purified against D4EDIII partially recognized D2EDIII, and vice-versa. This result is not surprising, as the experimental conditions were designed to force cross-reactivity further than in a classical sero-diagnostic test with high IgG concentrations. Instead, the experiment validates ZEDIII as a relevant antigen for sero-diagnosis. We further validated the high specificity of the humoral immune response against EDIII by assessing the ability of ZEDIII-immunized mouse sera to recognize recombinant EDIII. The sera of ZEDIII-positive mice did not recognize D4EDIII. As the D4EDIII amino-acid sequence is that closest to ZEDIII, it is possible that the result would be the same with any other *flavivirus* EDIII. Finally, we designed experiments using DEDIII-purified IgG to show that the observed sensitivity and specificity were due to only ZIKV-IgG binding to ZEDIII. The epitopes present on the surface of DEDIII were only recognized by IgG that did not recognize ZEDIII. IgG induced by ZEDIII immunization recognized only epitopes present on the surface of ZEDIII. Thus, the epitopes recognized by ZEDIII-IgG are highly different from those carried by D4EDIII and the EDIII epitopes are virus specific. We hypothesized that WNV induced IgG will not recognize ZEDIII.

To date, the most robust and specific ZIKV sero-diagnostic test is the PRNT, which is costly and time-consuming. ELISA is also commonly used but usually serves as a first-line screen prior to PRNT, due to its low specificity. Indeed, we showed that 71% of IgG diagnoses were not reliable with an ELISA performed with inactivated ZIKV and that 48% of *flavivirus* sera were ZIKV-cross-reactive. We assessed our ZEDIII-based-ELISA and the NS1-based-ELISA (Euroimmun Assay) on the selected sera of the four groups. The ZEDIII- and NS1-based-ELISAs for IgG were 89.9% to 92.6% and 83.8% to 89.3% specific (calculated with the *flavivirus* group (n = 99) or the *flavivirus* group plus the negative group (n = 149), respectively), and had a sensitivity of 92.0% and 96.0%, respectively (Table 4). The sensitivity determined for the NS1-based ELISA varies significantly, depending on the cohort used: from 70.7% with the cohort of Matheus *et al.* [21] to 88.4% (ZIKV-RT-PCR-positive group) or 92.0% (ZIKV-IgM-positive group) (Z-test between the ZIKV-RT-PCR-positive or ZIKV-IgM-positive groups and the cohort of Matheus *et al.*, p = 2.5257 and p = 4.4080, respectively). With our assay, the sensitivity varied non-significantly from 90.7% (ZIKV-RT-PCR-positive group) to 92.0% (ZIKV-IgM-positive group). The sensitivity of the ZEDIII-based ELISA can thus be considered stable. The ZIKV-IgM-positive group sera were collected in a DENV-endemic area, where the ZIKV infection is a second *flavivirus* infection, whereas this infection was the first for 65.6% of the ZIKV-RT-PCR-positive group. Thus, the difference in sensitivity could be due to this immunological scar.

Specificity is an important criterion for *flavivirus* diagnosis, as flaviviruses can induce cross-reactive IgG and high DENV prevalence is observed in the ZIKV endemic area. The specificity of the ZEDIII-based-ELISA was in the same range as that of the commercial test: within a 33.5% prevalence population, the probability of misdiagnosis would be 9.4% for the ZEDIII-based ELISA versus 12.1% for the NS1-based assay, which was not significantly different when considering the IC 95% overlap. However, unlike the NS1-based ELISA, the sensitivity of our assay did not depend on the cohort tested. Relative to the NS1-based ELISA, our assay would lead to the misdiagnosis of 1.9% additional positive patients but 7.1% fewer negative patients. The recombinant refolded ZEDIII domain could thus be a good target for diagnosis. According to Matheus *et al.* [21] and our study (data not shown), IgG raised against ZIKV and ZEDIII were still present, with at least 50% of the maximum OD_r, after 300 D_{PSO} and up to several years after infection [27]. This minor limitation could allow us to carry out retrospective seroprevalence studies of the ZIKV outbreak, whereas detecting ZIKV-induced IgG with ZEDIII could be used to detect recent past infections in populations at risk. A specific diagnosis must also be reliable for pregnant women or those planning to become pregnant to

indicate their ZIKV immunization status, and not necessarily at the first stages of putative ZIKV infection, to orient medical care, as ZIKV can cause miscarriage [28, 29].

Recombinant EDIII proteins have already been used as IgG-targets in ELISA and Microsphere ImmunoAssay to detect the immune response of horses and humans in seroprevalence studies [30–33] and, in particular, ZEDIII to link pathology to infection in humans [34, 35]. However, no study has yet clearly shown the limits, specificity, and sensitivity of a ZEDIII-based ELISA. Our study reinforces precedent EDIII findings and shows the use of recombinant *flavivirus* protein-based ELISAs, such as that based on ZEDIII, to be potentially reliable, offering opportunities to develop rapid, inexpensive, and specific first-line assays. Antibodies specific to the infecting *flavivirus* are able to protect against a new infection by neutralization [13, 36], whereas cross-reacting antibodies have been extensively linked to antibody-dependent enhancement, increasing viremia [37]. This phenomenon has been observed for both DENV- and ZIKV-induced antibodies [38]. Our results suggest that ZEDIII, by inducing a strong and specific immune response, could also be a safe model for the development of vaccines.

Supporting information

SD1 Fig. STARD flow diagram for the selection of the three reference panels (ZIKV-IgM-positive, *flavivirus*, and negative). Abbreviations: NRC, National Reference Center; DENV, Dengue Virus; ZIKV, Zika virus; NS1, Non-Structural protein 1; ZEDIII, Zika virus envelope protein domain III; PRNT, Plaque Reduction Neutralization Titration; WNV, West-Nile virus; ESLV, Encephalitis Saint-Louis virus; TOSV, Toscana virus; RVFV, Ross Valley Fever virus; CHKV, Chikungunya virus. The STARD flow diagram for selection of the ZIFAG cohort has been described in the study of De Laval *et al.* [20].
(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Xavier Brazzolotto for technical assistance and analysis with the MALS experiment.

Author Contributions

Conceptualization: Jessica Denis, Isabelle Leparc-Goffart, Bruno Coutard, Cyril Badaut.

Formal analysis: Jessica Denis, Véronique Chastres, Gilda Grard, Isabelle Leparc-Goffart, Bruno Coutard, Cyril Badaut.

Funding acquisition: Bruno Coutard, Cyril Badaut.

Investigation: Jessica Denis, Sarah Attoumani, Sébastien Briolant, Franck de Laval, Bruno Coutard.

Methodology: Jessica Denis, Sarah Attoumani, Patrick Gravier, Bernard Tenebray, Annabelle Garnier, Véronique Chastres, Cyril Badaut.

Project administration: Cyril Badaut.

Resources: Patrick Gravier, Bernard Tenebray, Sébastien Briolant, Franck de Laval, Gilda Grard, Isabelle Leparc-Goffart.

Supervision: Isabelle Leparc-Goffart, Bruno Coutard, Cyril Badaut.

Validation: Véronique Chastres, Gilda Grard, Isabelle Leparc-Goffart, Bruno Coutard.

Writing – original draft: Jessica Denis, Isabelle Leparc-Goffart, Bruno Coutard, Cyril Badaut.

References

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952; 46(5):509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4) PMID: 12995440.
2. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008; 14(8):1232–9. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287> PMID: 18680646.
3. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014; 20(6):1085–6. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138> PMID: 24856001.
4. Zanoluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015; 110(4):569–72. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192> PMID: 26061233.
5. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014; 19(9). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720>
6. Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. *Lancet*. 2016; 387(10033):2125–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00651-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00651-6)
7. Brasil P, Pereira JP Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*. 2016; 375(24):2321–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412> PMID: 26943629.
8. D’Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *The New England journal of medicine*. 2016; 374(22):2195–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1604449> PMID: 27074370.
9. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O’Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breast-milk. *Lancet*. 2016; 387(10023):1051. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00624-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00624-3) PMID: 26944028.
10. Organization WH. Neurological syndrome and congenital anomalies. WHO, 2016.
11. Organization WH. Laboratory testing for Zika virus infection. WHO, 2016 WHO/ZIKV/LAB/16.1.
12. Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medicine et maladies infectieuses*. 2014; 44(7):302–7. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008> PMID: 25001879.
13. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell*. 2017; 169(4):597–609 e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.024> PMID: 28475892.
14. Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedrosa C, et al. Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2017; 65(11):1829–36. <https://doi.org/10.1093/cid/cix672> PMID: 29020159.
15. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, Garcia N, Saborio S, Elizondo D, et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. *Journal of clinical microbiology*. 2018; 56(3). <https://doi.org/10.1128/JCM.01785-17> PMID: 29305550.
16. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine*. 2009; 360(24):2536–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715> PMID: 19516034.
17. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301):823–6. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505> PMID: 27417494.
18. Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin C, Fox JM, Bombardi RG, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016; 540(7633):443–7. <https://doi.org/10.1038/nature20564> PMID: 27819683.
19. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*. 2016; 166(4):1016–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.020> PMID: 27475895.

20. de Laval F, d'Aubigny H, Matheus S, Labrousse T, Ensargueix AL, Lorenzi EM, et al. Evolution of symptoms and quality of life during Zika virus infection: A 1-year prospective cohort study. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2018; 109:57–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.09.015> PMID: 30523784.
21. Matheus S, Talla C, Labeau B, de Laval F, Briolant S, Berthelot L, et al. Performance of 2 Commercial Serologic Tests for Diagnosing Zika Virus Infection. *Emerging infectious diseases*. 2019; 25(6):1153–60. <https://doi.org/10.3201/eid2506.180361> PMID: 31107211.
22. Lantez V, Dalle K, Charrel R, Baronti C, Canard B, Coutard B. Comparative production analysis of three phlebovirus nucleoproteins under denaturing or non-denaturing conditions for crystallographic studies. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011; 5(1):e936. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000936> PMID: 21245924.
23. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *Bmj*. 2015; 351:h5527. <https://doi.org/10.1136/bmj.h5527> PMID: 26511519.
24. van Meer MPA, Mogling R, Klaasse J, Chandler FD, Pas SD, van der Eijk AA, et al. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2017; 92:25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.001> PMID: 28505571.
25. Cordeiro MT, Brito CA, Pena LJ, Castanha PM, Gil LH, Lopes KG, et al. Results of a Zika Virus (ZIKV) Immunoglobulin M-Specific Diagnostic Assay Are Highly Correlated With Detection of Neutralizing Anti-ZIKV Antibodies in Neonates With Congenital Disease. *The Journal of infectious diseases*. 2016; 214(12):1897–904. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw477> PMID: 27923950.
26. L'Azou M, Jean-Marie J, Bessaud M, Cabie A, Cesaire R, de Lamballerie X, et al. Dengue seroprevalence in the French West Indies: a prospective study in adult blood donors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015; 92(6):1137–40. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0211> PMID: 25846291.
27. Henderson AD, Aubry M, Kama M, Vanhomwegen J, Teissier A, Mariteragi-Helle T, et al. Zika virus seroprevalence declines and neutralization antibodies wane in adults following outbreaks in French Polynesia and Fiji. *bioRxiv*. 2019:578211. <https://doi.org/10.1101/578211>
28. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mogling R, van Kampen JJ, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *The New England journal of medicine*. 2016; 375(10):1002–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1605898> PMID: 27463941.
29. Dudley DM, Van Rompay KK, Coffey LL, Ardeshir A, Keesler RI, Bliss-Moreau E, et al. Miscarriage and stillbirth following maternal Zika virus infection in nonhuman primates. *Nature medicine*. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0088-5> PMID: 29967348.
30. Beck C, Despres P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, et al. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *BioMed research international*. 2015; 2015:678084. <https://doi.org/10.1155/2015/678084> PMID: 26457301.
31. Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Brout J, Paulous S, et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015; 41:11–2. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.10.005>
32. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerging infectious diseases*. 2017; 23(4):669–72. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161549>
33. Beck C, Leparc-Goffart I, Desoutter D, Deberge E, Bichet H, Lowenski S, et al. Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS neglected tropical diseases*. 2019; 13(2):e0007162. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007162> PMID: 30730887.
34. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016; 387(10027):1531–9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
35. Simon O, Acket B, Forfait C, Girault D, Gourinat AC, Millon P, et al. Zika virus outbreak in New Caledonia and Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Journal of neurovirology*. 2018; 24(3):362–8. <https://doi.org/10.1007/s13365-018-0621-9>
36. Fernandez E, Dejnirattisai W, Cao B, Scheaffer SM, Supasa P, Wongwiwat W, et al. Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature immunology*. 2017. <https://doi.org/10.1038/ni.3849> PMID: 28945244.
37. Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science*. 2017; 356(6334):175–80. <https://doi.org/10.1126/science.aal4365> PMID: 28360135.

38. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113(28):7852–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607931113> PMID: [27354515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27354515/).

c. Conclusion de l'article

Dans cet article, nous avons présenté les travaux que nous avons menés pour tester la fiabilité d'un outil de détection des IgG basé sur la reconnaissance du ZEDIII. Celui-ci présente une forte sensibilité de 92,0%, et une forte spécificité de 89,9%. Sa fiabilité est au moins égale à celle déterminée avec le kit commercial, et moins variable selon les cohortes. Les IgG encore présentes 300 jours après l'apparition des symptômes permettent un diagnostic ZIKV tardif applicable pour les études de séroprévalence dans les populations et des études rétrospectives. Il est également applicable au dépistage chez les femmes enceintes ou souhaitant le devenir, permettant d'orienter le suivi médical face aux complications que peut apporter une infection ZIKV lors du développement du fœtus. L'emploi de protéines recombinantes tel que le ZEDIII offre une opportunité de développer un outil de diagnostic rapide, spécifique, peu coûteux en termes de temps et financier.

d. Réactivité croisée des anticorps humains dirigés contre les *Flavivirus*

Dans notre article nous avons montré l'absence de réactivité croisée des anticorps purifiés des sérums de patients à partir des EDIII de DENV sur le ZEDIII. Néanmoins, les anticorps purifiés sur le D2EDIII se sont révélés réactifs sur le D4EDIII, et vice versa, et cela de façon identique (environ 43%) (Figure 1). Ce croisement réciproque valide cette expérience et traduit l'homologie des séquences communes aux deux protéines. Cependant, les conditions de réalisation de cet ELISA ne sont pas physiologiques. En effet les anticorps purifiés sont enrichis en anticorps potentiellement capables de reconnaître plusieurs *Flavivirus*, cet enrichissement ne reflétant pas ce qui est trouvé dans les échantillons de patients. Il est donc peu probable qu'aux concentrations physiologiques, ce croisement soit observable avec une telle intensité. Cette observation renforce néanmoins les conclusions que nous avons émises vis-à-vis de l'absence de reconnaissance croisée du ZEDIII par les anticorps purifiés sur les EDIII de DENV.

Par ailleurs, nous avons testé la reconnaissance de D2EDIII et D4EDIII par les anticorps purifiés des sérums de patients sur ZEDIII (Figure 1). Il s'avère que contrairement à l'expérience précédemment décrite dans l'article, une réactivité croisée de l'ordre de 7,5% et 22,8% respectivement, est observée. Ces anticorps purifiés proviennent tous de sérums issus du groupe de patients ayant été positifs en IgM anti ZIKV et, vivant en zone de forte endémie, ils présentent pour la plupart une cicatrice sérologique aux *Flavivirus*. Les patients de

l'expérience précédente étaient, au contraire, négatifs pour ZIKV mais présentaient une cicatrice sérologique aux autres *Flavivirus*.

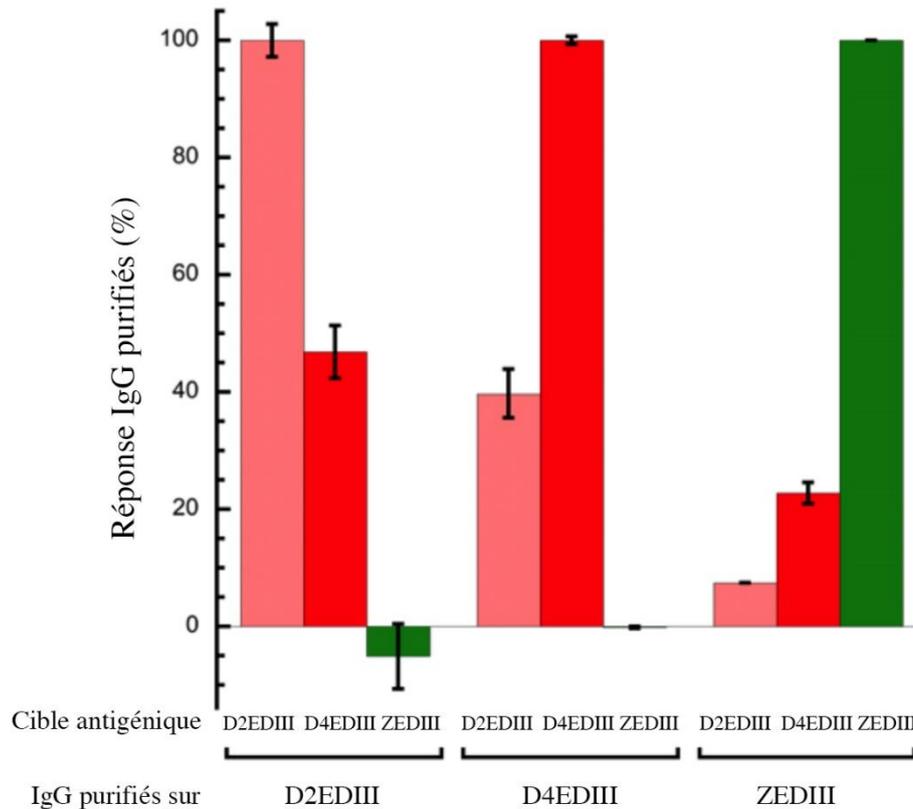


Figure 1. Intensité de réponse des IgG purifiés sur les ZEDIII ou DEDIII sur les différentes cibles antigéniques en ELISA. Sont représentés les moyennes des rapports de Densité Optique normalisés sur chaque antigène cible et l'écart-type à la moyenne. Les résultats des ELISA avec les anticorps purifiés sur D2EDIII, D4EDIII ou ZEDIII sont représentés, en rouge clair sur la cible D2EDIII, en rouge foncé sur la cible D4EDIII et en vert sur la cible ZEDIII.

Certains anticorps monoclonaux issus de patients n'ayant été infectés que par la DENV reconnaissent à la fois DENV et ZIKV (Priyamvada *et al.* 2016). Cependant, dans notre étude, les anticorps purifiés sur les EDIII de DENV issus du groupe positif à plusieurs *Flavivirus* mais naïfs pour ZIKV ne reconnaissent que les EDIII de DENV. Par ailleurs, les anticorps purifiés sur le EDIII de ZIKV issus du groupe positif ZIKV et présentant une cicatrice sérologique flavivirale reconnaissent à la fois les EDIII de DENV et ZIKV. Cette réactivité croisée pourrait être due aux anticorps initialement induits par la DENV. En effet, une infection par ZIKV permettrait de réactiver certains lymphocytes B mémoires d'anciennes infections, dues par exemple à la DENV, dont le paratope est suffisamment affin pour les épitopes ZIKV. Ces lymphocytes B mémoires pourraient avoir subi des hypermutations

somatiques du matériel génétique exprimant son paratope pendant l'expansion clonale ce qui aurait pour conséquence une augmentation de son affinité pour ZIKV (Bhaumik *et al.* 2018; Rogers *et al.* 2017) et notamment pour le ZEDIII. Ainsi, ces anticorps purifiés, qui reconnaissent à la fois les EDIII de DENV et ZIKV, ont été amplifiés lors de la seconde infection flavivirale et peuvent être détectés en ELISA. Ces anticorps induits, *in fine*, par une infection ZIKV en sont, comme les anticorps spécifiques de ZIKV, la signature. Dans les conditions mises au point pour notre diagnostic, la proportion physiologique dans les sérums et l'affinité des anticorps non-réactivés par une infection ZIKV semblent ne pas permettre de dépasser la limite de détection en ELISA et donc de les observer.

Les conditions expérimentales utilisées pour réaliser ces expériences sont donc loin des conditions physiologiques et très différentes de celles optimisées pour le diagnostic publié (Denis *et al.* 2019). Elles sont à rapprocher des travaux réalisés avec des anticorps monoclonaux par d'autres équipes (Bhaumik *et al.* 2018; Priyamvada *et al.* 2016 ; Rogers *et al.* 2017). En revanche, ce type d'outil pourrait être très utile pour comprendre l'origine de sérocroisement dans des expériences plus fondamentales, en opposition aux expériences réalisées jusqu'à maintenant sur des anticorps monoclonaux ne reflétant pas la réalité sérologique. L'étude de mélange d'anticorps serait plus pertinente.

e. Application de notre outil de diagnostic aux études épidémiologiques - cas concret d'un échantillon

Plusieurs facteurs sont en cause pour expliquer le retard de diagnostic des premiers cas d'infection par ZIKV lors de l'émergence d'une endémie. En zone de co-endémie avec la DENV, où seul 20 % de la population infectée par ZIKV présente des pathologies qui sont le plus souvent similaires, il est difficile de rendre un diagnostic fiable plus de 4 jours après le début des signes en l'absence d'un test moléculaire.

ZIKV semble avoir été introduit au Brésil plusieurs mois avant les premières infections observées dans le nord du pays début 2015. En effet, sa détection en avril 2013 chez des patients de Rio de Janeiro (Passos *et al.* 2017) et l'analyse phylogénétique de la séquence du virus retrouvé dans les moustiques *Aedes aegypti* estiment son introduction au Brésil entre octobre 2012 et mai 2013 (Ayllon *et al.* 2017). Différents événements pourraient être à l'origine de son introduction : (i) la coupe de football des confédérations qui a eu lieu en juin 2013 où une équipe participante venait de Polynésie française (Faria *et al.* 2016), (ii) la coupe de football de plage qui a eu lieu à Tahiti mais où étaient présents un grand nombre d'athlètes

et de supporters brésiliens entre juillet et novembre 2013 (Le Hingrat *et al.* 2019) où sévissait une épidémie ZIKV (Cao-Lormeau *et al.* 2016) qui s'est étendue d'octobre 2013 à avril 2014, induisant une séroprévalence de 49% après l'épidémie (Aubry *et al.* 2017) ou encore (iii) la coupe du monde de football qui s'est tenue au Brésil en 2014 (Faria *et al.* 2016). Néanmoins, d'autres analyses phylogénétiques ont mis en lumière la circulation de ZIKV sur le continent américain (Faria *et al.* 2016 ; Le Hingrat *et al.* 2019) et dans les Caraïbes bien avant l'épidémie de 2015-2016, notamment à Haïti où une souche a été isolée (Numéro d'accession : KU509998) en décembre 2014 (Lednicky *et al.* 2016). Les résultats de l'analyse de la séquence du gène NS5 (Lednicky *et al.* 2016) estiment son introduction mi-2013. Les îles des Caraïbes comprennent de nombreuses îles dont Haïti, la Guadeloupe, la Martinique toutes réunies et liées entre elles par des flux de population.

Dans notre étude, nous avons sélectionné des échantillons de patients (n = 99) ayant été diagnostiqués positifs pour plusieurs *Flavivirus*, autres que ZIKV. Ces échantillons ont été prélevés entre 2013 et 2014 en Guadeloupe, Martinique et Saint-Martin qui sont des territoires endémiques pour la DENV mais où ZIKV ne circulait pas encore. La moyenne de reconnaissance du ZEDIII par les IgG de ce groupe était de rDO = 1,06 et 10% des individus de ce groupe étaient positifs. Alors que les valeurs de reconnaissance du ZEDIII par les IgG des échantillons faux positifs de ce groupe varient de rDO = 1,54 à 2,59, un seul échantillon présentait un rDO de 6,26.

Cette patiente est une femme alors âgée de 48 ans, prélevée en France métropolitaine 15 jours après le début des signes cliniques en novembre 2013. Elle rentrait d'un séjour en Guadeloupe. Le sérum a été envoyé au CNR des arbovirus pour être diagnostiqué et les résultats du sérodiagnostic sont présentés dans la table 1. Nous avons observé l'absence d'IgM dirigée contre ZIKV, la présence d'IgM dirigées contre DENV et WNV (rDO = 7,8 et 3,7 respectivement) et la présence d'un fort taux d'IgG dirigée contre les différents *Flavivirus* testés. Nous avons également observé au cours de notre essai une très forte présence d'anticorps dirigés contre le ZEDIII (rDO = 6,26) et D4EDIII (rDO = 8,26) mais aucun anticorps dirigé contre le D2EDIII (rDO = 1,66). Ces résultats sont en accord avec le résultat de la séroneutralisation ; le titre d'anticorps neutralisant ZIKV est de 1/40, 1/80 pour la DENV4 alors que qu'il est inférieur à 1/40 pour la DENV2.

Table 1. Résultats du sérodiagnostic.

	DENV2	WNV	CHIKV	ESLV	ZIKV	ZEDIII	D2EDIII	D4EDIII
rDO IgM	7,8	3,7	1	2	1,1	ND	ND	ND
rDO IgG	30	21	1	9	7,5	6,26	1,66	8,26

Abréviations : DENV2, virus de la dengue (sérotipe 2). WNV, virus du Nil occidental. CHIKV, virus du chikungunya. ESLV, virus de l'encéphalite Saint-Louis. ZIKV, virus Zika. ZEDIII, domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika. D2EDIII et D4EDIII, domaine III de la protéine d'enveloppe du virus de la dengue sérotipe 2 et 4 respectivement. rDO, rapport de Densité Optique. Le seuil de positivité des ELISA DENV2, WNV, CHIKV, ESLV et ZIKV est fixé à un rDO de 3. Les seuils de positivité des ELISA ZEDIII, D2EDIII et D4EDIII sont fixés à un rDO de 1,54, 2,09 et 1,82 respectivement (Denis *et al.* 2019).

Grâce à l'élaboration de courbes de cinétiques des IgM en réponse à ZIKV (présentés dans le chapitre I.3 des résultats), et au vu de son statut sérologique nous pouvons estimer que cette personne aurait été infectée par ZIKV au moins plus de 60 jours avant son prélèvement et que le dernier virus infectant n'est pas ZIKV mais un autre *Flavivirus*. Selon les résultats de séroneutralisation, le dernier virus infectant semble être le sérotipe 4 de DENV et les tests ELISA réalisés sur le D2EDIII et D4EDIII vont dans ce sens. Ce résultat est concordant avec le statut épidémiologique, à cette époque la DENV4 était le sérotipe majoritaire circulant en Guadeloupe, avec plus de 80 % des cas entre juillet 2013 et janvier 2014 (CIRE 2015).

Cet échantillon présente une intensité de réponses IgG sur le ZEDIII de rDO = 6,26. La moyenne de reconnaissance du groupe des négatifs étant de 1,17, cela représente un écart à la moyenne supérieur à 40 fois l'écart-type ($\sigma = 0,13$). Au vu des tables statistiques, la probabilité pour que cette patiente soit un faux positif est nulle. Il est donc fortement probable que cette patiente a réellement déjà été infectée. Cette observation est renforcée par la séroneutralisation de ZIKV par le sérum de la patiente. Ces résultats ainsi que les études de la sensibilité du test face aux réactions croisées réalisées dans notre article et dans le chapitre I.1.d nous permettent de penser que cette patiente a déjà été infectée par ZIKV. De ce résultat plusieurs hypothèses sont envisageables : (i) cette femme pourrait avoir voyagé dans le passé dans une zone où circulait ZIKV, (ii) le virus circulait déjà en Guadeloupe et si cette femme voyageait régulièrement elle pourrait avoir été infectée par piqûre de moustique, (iii) cette femme pourrait avoir été contaminée par voie sexuelle. Aucun diagnostic moléculaire ou sérologique d'infection ZIKV n'ayant été mis en place à cette époque dans cette région, il est

difficile d'en tirer des conclusions solides qui ne peuvent rester qu'à l'état d'hypothèse. De plus, il est difficile de déterminer, avant l'émergence avérée, la présence d'une circulation de ce virus, de par la réactivité croisée des anticorps observée chez les *Flavivirus*, ainsi que l'absence de recherche de signature de l'infection (anticorps ou antigène), avant qu'une épidémie d'envergure ne débute ou que leur présence n'ait été scientifiquement démontrée.

Des cas importés en Nouvelle Calédonie de l'épidémie de ZIKV en Polynésie Française de 2013, sont suivis des premiers cas autochtones (Nhan *et al.* 2014) montrant la possibilité de l'émergence du virus sur d'autres territoires. Bien que les premiers cas ZIKV ont été confirmés en Guadeloupe en décembre 2015 (Daudens-Vaysse *et al.* 2016), il a été montré que les introductions virales pouvaient avoir lieu plusieurs mois avant l'apparition de l'épidémie et la détection des premiers cas (Metsky *et al.* 2017). La suspicion d'une arrivée de ZIKV dans les Iles des Caraïbes avant son émergence au Brésil semble donc plausible. Même si l'analyse phylogénétique a été réalisée avec une seule séquence haïtienne parmi de nombreuses autres, elle semble étayer fortement cette hypothèse. De plus ces îles sont proches géographiquement, les flux de populations non négligeables, et le vecteur *Aedes aegypti*, efficace pour la transmission du virus, est présent dans cette zone (Chouin-Carneiro *et al.* 2016) permettant sa circulation. Une étude épidémiologique est en cours afin de documenter les éventuelles infections flavivirales passées, les différents voyages et la durée des séjours dans des zones endémiques effectuées par cette patiente. N'ayant pour le moment aucune information, nos conclusions restent à l'état d'hypothèse.

2. Application de l'ELISA basée sur la reconnaissance du ZEDIII au diagnostic de routine du CNR des arbovirus - Article 2

Un cas d'infection au ZIKV a été diagnostiqué en octobre 2019 par le CNR des arbovirus de Marseille. Des études rétrospectives et prospectives ont été mises en place et ont permis d'identifier deux autres cas avérés, géographiquement proches du premier cas. La transmission autochtone vectorielle semble avoir eu lieu en août 2019 dans le sud de la France (département du Var) (Giron *et al.* 2019). La souche impliquée appartient au lignage asiatique et serait importée non pas du continent américain mais plus probablement du Sud-Est asiatique (Durand *et al.* 2020). Les cas suspects ont été sérodiagnostiqués par ELISA et par séroneutralisation. Des IgM et IgG dirigés contre ZIKV ont été détectés en ELISA avec ZIKV par le CNR des arbovirus ou le ZEDIII, outil de diagnostic développé aux cours de mes travaux de thèse. Le diagnostic du premier cas détecté confirme la capacité de détection d'une

infection d'une souche non prédéterminée, par l'ELISA développé au cours des travaux de thèse.

Article 2

Vector-Borne Transmission of the Zika Virus Asian Genotype in Europe.

Guillaume A. Durand, Géraldine Piorkowski, Laurence Thirion, Laetitia Ninove, Sandra Giron, Christine Zandotti, Jessica Denis, Cyril Badaut, Anna-Bella Failloux, Gilda Grard, Isabelle Leparç-Goffart and Xavier de Lamballerie

Brief Report

Vector-Borne Transmission of the Zika Virus Asian Genotype in Europe

Guillaume A. Durand ^{1,2,*}, Géraldine Piorkowski ², Laurence Thirion ², Laetitia Ninove ², Sandra Giron ³, Christine Zandotti ², Jessica Denis ^{1,4}, Cyril Badaut ^{1,4}, Anna-Bella Failloux ⁵, Gilda Grard ^{1,2}, Isabelle Leparc-Goffart ^{1,2} and Xavier de Lamballerie ²

¹ National Reference Laboratory for Arboviruses, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 13010 Marseille, France; jessica.d03@orange.fr (J.D.); cbadaut@gmail.com (C.B.); gilda.grard@inserm.fr (G.G.); isabelle.leparcgoftart@gmail.com (I.L.-G.)

² Unité des Virus Emergents (UVE: Aix-Marseille Univ-IRD 190-Inserm 1207-IHU Méditerranée Infection), 13010 Marseille, France; geraldine.piorkowski@inserm.fr (G.P.); laurence.thirion@ird.fr (L.T.); laetitia.ninove@ap-hm.fr (L.N.); christine.zandotti@ap-hm.fr (C.Z.); xavier.de-lamballerie@univ-amu.fr (X.d.L.)

³ French National Public Health Agency (Santé publique France), 13002 Marseille, France; sandra.giron@santepubliquefrance.fr

⁴ Unité de Biothérapies anti-Infectieuses et Immunité, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, 91220 Breteuil sur Orge, France

⁵ Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; anna-bella.failloux@pasteur.fr

* Correspondence: guillaume.durand@inserm.fr

Received: 14 February 2020; Accepted: 7 March 2020; Published: 9 March 2020



Abstract: Three autochthonous cases of Zika virus occurred in southern France in August 2019. Diagnosis relied on serology and transcription-mediated amplification. Attempts for virus isolation and ZIKV genome RT-PCR detection remained negative. Since the index case was not identified, we addressed the issue of genotyping and geographical origin by performing hemi-nested PCR and sequencing in the Pr gene. Analysis of 16 genotype-specific Single Nucleotides Polymorphisms identified the Asian genotype and suggested a Southeast Asia origin.

Keywords: arbovirus; zika; France; *Aedes albopictus*; autochthonous transmission; genotyping

1. Introduction

The first vector-borne transmission of Zika virus (ZIKV) in Europe has been reported recently [1]. It occurred during August 2019 in the Mediterranean coastal department of Var (city of Hyeres) within an area of permanent implantation of *Aedes albopictus*, which represents the only potential vector locally. During the first steps of investigation, a small cluster of three cases that occurred in August 2019 was discovered retrospectively (in October 2019) within a circle with a radius 50 meters. The index case was not identified and the issue of the geographical origin and genetic typing of the virus strain remained unanswered. This question is of specific importance since recent vector competence studies suggested that *Ae. albopictus* from France can transmit more efficiently the African genotype of ZIKV than the Asian genotype [2]. The latter includes both viruses that have been circulating in Asia for decades (as far as is known without causing large epidemics), and viruses that circulated during the recent important outbreaks in the Americas (mostly Latin America and the Caribbean) [3,4]. The aim of the current study was to determine the ZIKV genotype implicated in cases of local transmission in France, 2019.

2. Standard Laboratory Investigations

The first case, a 52-year-old woman, and then two additional cases, respectively a 47-year-old man and a 62-year-old woman, were identified using serological techniques. All cases were neighbours living in the same area (<100 m radius); they did not know each other. Neither cases nor sexual partners were found to have travelled outside the city within the 15 days before the onset of symptoms. Serology performed on the children and partners of the cases were negative. No Asian shop or warehouse receiving stock from Asia were found in this residential area. Earlier samples were tested by molecular approaches, whereas later ones were tested using in-house ELISA with a whole precipitated and inactivated virus, Zika EDIII recombinant protein (IgM and IgG antibodies to ZIKV), and confirmed by virus neutralization test. All cases were found positive in ELISA, Zika EDIII-based ELISA and virus neutralization, and negative for neutralizing antibodies against West-Nile and Dengue serotype 1 to 4 viruses [5]. All attempts for virus isolation and detection of the ZIKV genome by RT-PCR (RealStar Zika Virus RT-PCR kit, Altona Diagnostics, Germany [6]) in serum, urine and semen were negative, even in early samples collected less than two days after onset. This was presumably because of a conjunction of unfavourable circumstances including initial low viral loads, iterative freeze–thaw cycles and suboptimal conservation temperatures.

3. TMA, Nested PCR and Sequencing Strategy

This situation rendered usual sequencing techniques inappropriate and, with the constraint of limited availability of biological resources, led to imagining a different typing strategy:

1. We used the extremely sensitive Transcription-Mediated Amplification (TMA) technology (Hologic, Marlborough, Massachusetts, United States [7]) to identify samples in which residual amounts of the ZIKV RNA genome could be detected from serum.
2. We performed *in silico* sequence analysis to identify genomic regions in which genotype-specific single nucleotide polymorphisms (SNP) would allow a clear distinction between the African and Asian genotypes of ZIKV. Such SNPs are present in different parts of the genome, but the Pr gene is of specific interest because it includes 16 SNPs, which individually strictly discriminate between the Asian and African genotype (see Figure 1a). It is therefore expected that sequencing this region would allow the unambiguous identification of the genotype incriminated. We designed a hemi-nested PCR set of primers allowing the amplification of a 139-nt sequence (primers excluded), including these SNPs (Supplementary Materials). All amplifications were performed in quadruplicate in the presence of 10 (PBS) negative controls. When tested, electrophoresis onto agarose gels of secondary PCR products revealed a band corresponding to the expected size in Case 3 from Day 1's sample for three replicates, whereas PBS controls remained negative.
3. We used the secondary PCR reaction of all tested samples and negative controls for NGS sequencing using the S5 Ion Torrent technology (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, United States) [8]. Details are provided in the Supplementary Materials.

(a) IDENTIFICATION OF GENOTYPE																									
SNPs nucleotide position in ORF	414			427	435	442	444		457	462	468	469		472	489	492		504	516	522			543		
African genotype	G			A*	T	G*	T		G*	C	C	C*		G*	C	G		C	T	G/A ^Δ			A,G ^Δ		
Asian genotype	A			G	A	C	A		A	T	T/C	T/C*		A/G*	T	A		T	C	A			G		
Hyères ZIKV	A			G	A	C	A		A	T	T	T		A	T	A		T	C	A			G		
(b) POLYMORPHISM IN THE ASIAN GENOTYPE																									
Nucleotide position in ORF		416	417					451			468	469	471	472			495				523	534		545	546
Hyères ZIKV		G	C					C			T	T	T	A			C				T	G		T	A
Asian genotype from South-East Asia 141 sequences with 0 mismatch		G	C					C			T	T	T	A			C				T	G		T	A
Asian genotype from South-East Asia 17 sequences with 1 mismatch		A	T					A*			C	C*	C	G*			T				C*			C*	G
		(1/17)	(1/17)					(3/17)			(2/17)	(1/17)	(2/17)	(1/17)			(2/17)				(1/17)			(1/17)	(2/17)
Asian genotype from South-East Asia 1 sequences with 2 mismatches								T														A*			
Asian genotype from Americas 86 sequences with 3 mismatches		A*	C					T					T				C				T	G		T	G

Figure 1. Identification of the genotype (a) and analysis of polymorphism in the Asian genotype (b). * Non-synonymous mutations. Δ Present only in sequence KY288905.

4. Genotyping and Probable Geographical Origin of the Strain

Sequence analysis identified ZIKV-specific reads for three of the four replicates from Case 3, and none for the other samples and the negative controls. A nucleotide Blast analysis of the consensus sequence was performed versus GenBank. Blastn was performed on 250 sequences; 245 sequences were conserved (excluding three synthetics, according to their titles names, and two duplicated sequences) for further examination. Figure 1b presents the results obtained for these 245 more closely related sequences. Sequence analysis showed that all 16 SNPs were specific of the Asian genotype. Further examination revealed that 141 sequences in GenBank were 100% identical with Case 1’s sequence, and all of them corresponding to ZIKV strains from Southeast Asia; 17 sequences from the same geographical region had one nucleotide mismatch and one had two mismatches. By contrast, 86 sequences from the American strains displayed three or more mismatches.

5. Discussion

In conclusion, the strain implicated in ZIKV autochthonous vector-borne transmission in the Var region belonged to the Asian genotype and was most probably imported from Southeast Asia (and not from the Americas). This was unexpected since previous vector competence studies found that both “Asian” and “American” strains belonging to the Asian genotype of ZIKV were poorly transmitted by French *Ae. albopictus* [2]. We propose several hypotheses that may allow reconciling these experimental and epidemiological findings.

First, the actual transmission potential of the incriminated ZIKV strain by local *Ae. albopictus* may be higher than suggested by previous competence studies. The mosquitoes used in these studies (collected in Corsica (2017) and Montpellier (2018)) may not adequately represent the populations implanted in Hyères. This may be investigated by renewing these experiments using mosquitoes collected at the precise location where autochthonous transmission occurred. Similarly, the transmission potential of the Asian strain used in competence studies (namely ZIKV Cambodia isolated from a human case in 2010 (FSS 13025, Asian genotype, passage 3, GenBank reference: KU955593)) may be

different from that of the Hyères strain. This strain includes one mismatch in the sequence described above, which is associated with a L/M amino-acid substitution. However, in the absence of isolation and complete genomic sequencing of this strain, it will be difficult to further investigate this item.

Second, environmental conditions may have contributed to allow local transmission despite the limited vector competence suggested by the limited amplitude of the epidemic event. Some inhabitants in the area of transmission reported unusually high vector densities, which epidemiological field investigations linked to the existence of an unmaintained pool that acted as a “mosquito factory”. The meteorological conditions in 2019 were quite specific: The peak temperature occurred early (in July vs. August usually) and was higher than the previous years; in addition, the summer months were very dry. Such conditions may have contributed to create specific transmission conditions, different from those observed under experimental conditions.

In conclusion, this study allowed identifying the genotype (Asian) and the most probable geographical origin (Southeast Asia) of the ZIKV strain implicated in the first Zika virus local vector-borne transmission in Europe. It shows that virus genotyping can be obtained from samples with low viral load by combining SNPs identification and NGS sequencing. It finally calls to a careful interpretation of experimental competence studies, which can indeed provide a comparative estimate of the transmission capacity associated to specific mosquito and virus strains, but reflect specific combinations of mosquitoes, viruses and environmental conditions.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/12/3/296/s1>, File F1: Supplementary Materials.

Author Contributions: Diagnosis (serology, RT-PCR, neutralisation) and analysis of results, G.A.D., I.L.-G., G.G., L.N., C.Z., S.G., A.-B.F., X.d.L., T.M.A., L.T. and NGS; sequencing and analysis, G.P.; EDIII Zika ELISA, J.D. and C.B.; writing and supervision, G.A.D., I.L.-G. and X.d.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Karine Barthélémy, Magali Gilles.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Giron, S.; Franke, F.; Decoppet, A.; Cadiou, B.; Travaglini, T.; Thirion, L.; Durand, G.; Jeannin, C.; L’Ambert, G.; Grard, G.; et al. Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Euro Surveill.* **2019**, *24*, 1900655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vazeille, M.; Madec, Y.; Mousson, L.; Bellone, R.; Barré-Cardi, H.; Sousa, C.A.; Jiolle, D.; Yébakima, A.; de Lamballerie, X.; Failloux, A.-B. Zika virus threshold determines transmission by European *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1668–1678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pettersson, J.H.-O.; Bohlin, J.; Dupont-Rouzeyrol, M.; Brynildsrud, O.B.; Alfsnes, K.; Cao-Lormeau, V.-M.; Gaunt, M.W.; Falconar, A.K.; de Lamballerie, X.; Eldholm, V.; et al. Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pettersson, J.H.-O.; Eldholm, V.; Seligman, S.J.; Lundkvist, Å.; Falconar, A.K.; Gaunt, M.W.; Musso, D.; Nougairède, A.; Charrel, R.; Gould, E.A.; et al. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *mBio* **2016**, *7*, e01239-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Denis, J.; Attoumani, S.; Gravier, P.; Tenebray, B.; Garnier, A.; Briolant, S.; de Laval, F.; Chastres, V.; Grard, G.; Leparac-Goffart, I.; et al. High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Öschlager, S.; Enfissi, A.; Zaruba, M.; Kazanji, M.; Rousset, D. Diagnostic Validation of the RealStar®Zika Virus Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Kit for Detection of Zika Virus RNA in Urine and Serum Specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 1070–1071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Ren, P.; Ortiz, D.A.; Terzian, A.C.B.; Colombo, T.E.; Nogueira, M.L.; Vasilakis, N.; Loeffelholz, M.J. Evaluation of Aptima Zika Virus Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2198–2203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Moutailler, S.; Yousfi, L.; Mousson, L.; Devillers, E.; Vazeille, M.; Vega-Rúa, A.; Perrin, Y.; Jourdain, F.; Chandre, F.; Cannet, A.; et al. A New High-Throughput Tool to Screen Mosquito-Borne Viruses in Zika Virus Endemic/Epidemic Areas. *Viruses* **2019**, *11*, 904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 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 (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

L'étude des performances de l'ELISA basé sur le ZEDIII a été réalisée avec le lignage asiatique, souche de Polynésie Française de 2013 (H/PF/2013, numéro d'accession : AHZ13508) et les sérums issus de la cohorte positive pour ZIKV proviennent eux aussi de patients ayant été présents en zones endémiques du lignage asiatique. Aucune étude n'a été réalisée avec le lignage africain, dont les épidémies se font rares, et le lignage infectant des sérums disponibles dans la sérothèque du CNR des arbovirus n'est pas caractérisé. Les capacités de sérodiagnostic des infections par le lignage africain avec cet outil sont donc difficilement évaluables et incertaines. Cependant, un alignement de séquence en acides aminés du ZEDIII des différents lignages (Afrique de l'Est, Centrale, Ouest et asiatique) ainsi que les 4 sérotypes de DENV (matrice Blosum62) permet de comparer les homologies et identités de séquence protéique. Les résultats sont présentés dans la table 1. Nous observons plus de 98% d'homologie de séquence et plus de 96% d'identité de séquence entre le lignage asiatique et les lignages africains. Cette forte homologie de séquence permet de supposer que le lignage de la souche épidémique aurait un effet mineur sur les performances du diagnostic. Les faibles homologies et identités entre les ZEDIII et les EDIII des sérotypes de DENV peuvent expliquer l'absence de reconnaissance croisée de ces domaines par des anticorps induits par les virus respectifs.

Table 1. Homologie et identité de séquence protéique du EDIII entre les différents lignages de ZIKV et les sérotypes de DENV.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1) ZIKV, Afrique de l'Est		100	98,1	100	75,0	74,1	75,0	75,0
(2) ZIKV, Afrique Centrale	98,1		98,1	100	75,0	74,1	75,0	74,1
(3) ZIKV, Afrique de l'Ouest	96,3	98,1		98,1	73,1	73,1	75,0	72,2
(4) ZIKV, Asiatique	96,3	98,1	96,3		75,0	74,1	75,0	74,1
(5) DENV1	49,1	48,1	47,2	49,1		84,8	92,4	87,6
(6) DENV2	44,4	43,5	43,5	43,5	61,9		84,8	86,7
(7) DENV3	45,4	44,4	44,4	43,5	69,5	60,0		81,9
(8) DENV4	49,1	50,0	49,1	49,1	56,2	61,0	51,4	

Homologie de séquence protéique (%) des EDIII en haut à droite en nuances d'orange et identité de séquence protéique (%) des EDIII en bas à gauche en nuances de gris. (1) ZIKV, Afrique de l'Est, MR766, Ouganda, 1947, AAV34151. (2) ZIKV, Afrique Centrale, ArB1362, Bouboui, 1968, AHL43500. (3) ZIKV, Afrique de l'Ouest, IbH_30656, Nigeria, 1968, AEN75265. (4) ZIKV, Asiatique, H/PF/2013, Polynésie Française, 2013, AHZ13508. (5)

DENV1, DENV1-17388, Jamaïque, 2012, ANC57575. (6) DENV2, G2AE, Mexique, 2012, QBQ87236. (7) DENV3, 2424900, Malaisie, 2011, SNQ41863. (8) DENV4, DENV4-002, Vietnam, 2016, AST12925.

Ces résultats permettent de renforcer la fiabilité de notre outil de diagnostic ZIKV. En effet, bien qu'elle ait été testée avec une cohorte caractérisée et homogène, le cas d'Hyères dont la provenance et la séquence étaient inconnues s'est révélé positif avec notre outil, ce résultat validant la stabilité de notre test. Cependant cette souche provient du lignage asiatique et sa séquence du ZEDIII présente sans doute une forte homologie à celle que nous avons utilisée dans nos travaux.

3. Cinétique des IgM et des IgG lors d'infection ZIKV chez l'homme - impact sur la fenêtre d'emploi de l'outil de sérodiagnostic

a. Introduction

Lors d'une infection virale, une réponse immunitaire humorale est induite conduisant à la production d'anticorps contre ce virus. Comme pour la plupart des réponses primaires à une infection, une apparition rapide des IgM suivie des IgG est couramment observée lors d'une infection flavivirale. Lors d'une infection secondaire homologue, la quantité des IgM peut être en dessous du seuil de détection des outils de diagnostic et ne jamais être détectée. En phase de convalescence, la concentration de ces anticorps sérique continue d'évoluer. Afin d'employer les outils de sérodiagnostics en accord avec leurs performances et afin de rendre des résultats fiables, étudier leur fenêtre d'utilisation est nécessaire. Le suivi de l'apparition et la disparition des anticorps au cours du temps, requiert (i) un outil de détection sensible, spécifique et surtout quantitatif ou semi-quantitatif, (ii) des échantillons prélevés chez des patients à différents temps et assez rapprochés et (iii) un grand nombre d'individus afin d'en tirer des conclusions fiables. Ainsi connaître la cinétique de ces anticorps et l'intensité précise de cette réponse nous permettrait de (1) connaître le statut d'un individu suspecté d'infection, (2) de déterminer sa protection, qu'elle soit induite par une vaccination ou une infection naturelle et (3) d'émettre des recommandations sur la fenêtre d'employabilité des outils de diagnostic. L'outil de diagnostic ELISA du CNR des arbovirus, réalisé sur ZIKV, et celui que nous avons mis au point, réalisé sur le ZEDIII, sont sensibles, spécifiques et semi-quantitatifs. Ils répondent donc aux critères nécessaires pour réaliser la cinétique d'apparition et de disparition des IgM et IgG respectivement.

De nombreuses études ont été menées pour suivre les cinétiques d'anticorps induits lors d'une infection virale contre la protéine NS1 (Barzon *et al.* 2018 ; Jeong *et al.* 2017 ; Matheus *et al.* 2019; Pasquier *et al.* 2018 ; Steinhagen *et al.* 2016) ou contre la protéine E (Yu *et al.* 2017 ; Zhao *et al.* 2019) mais ces dernières ont été réalisées sur quelques patients. Nous disposons d'une cohorte de patients, issus de la cohorte ZIFAG (de Laval *et al.* 2018 ; Matheus *et al.* 2019), infectés par ZIKV et pour lesquels des prélèvements ont été réalisés régulièrement jusqu'à, pour certains individus, plus de 300 jours après le début des symptômes. Malgré ces nombreux prélèvements, il est impossible de pouvoir déterminer (a) le jour où la concentration en anticorps atteint son maximum, (b) l'amplitude maximale de la réponse en ELISA reflétant la concentration maximale d'anticorps sérique ou (c) le jour de « positivation » et (d) de négativation à partir desquels le taux d'anticorps est considéré comme détectable ou non détectable dans le sang, respectivement, avec cet outil. Grâce à l'ajustement de courbe et à partir des points expérimentaux, nous avons déterminés ces 4 paramètres pour chaque patient en utilisant 2 modèles mathématiques pertinents : le modèle de Wood, initialement utilisé pour suivre la lactation des vaches américaines (Cole *et al.* 2009; Wood 1967), et le modèle de suivi d'un composé A2 issu d'un modèle monomoléculaire successif décrit couramment en chimie. Le premier modèle mathématique est également utilisé pour le suivi des virémies porcines (Hess *et al.* 2016; Islam *et al.* 2013) et depuis peu pour le suivi de la réponse anticorps (Andraud *et al.* 2018).

Cette étude a été menée sur les IgM dirigées contre les virus entiers inactivés ZIKV et de la DENV et les IgG dirigées contre les virus entiers inactivés de ZIKV et de la DENV, ainsi que contre les domaines recombinants ZEDIII, D2EDIII et D4EDIII pour tous les militaires inclus dans cette cohorte. Elle nous a permis de définir précisément les fenêtres de détection des IgM anti-ZIKV et des IgG anti-ZEDIII associés à une réponse immunitaire humorale face à une infection due à ZIKV. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence l'existence de groupes de patients, en fonction de leur jour de négativation en IgM anti-ZIKV, d'une part, de leur cicatrice sérologique flavivirale d'autre part, ou encore de leur score clinique. Nous avons également trouvé une relation entre certains groupes et l'intensité de la virémie.

b. Matériel et méthodes

a. Description de la cohorte

La cohorte ZIFAG (de Laval *et al.* 2018 ; Matheus *et al.* 2019), composée de 49 patients vivants en Guyane française, a été suivie pendant une année pendant l'épidémie de ZIKV en 2016. Des prélèvements sanguins ont été réalisés après le début des symptômes. Une RT-qPCR était réalisée sur les premiers prélèvements, tous les patients étaient positifs pour ZIKV. Le nombre de copies d'ARN viral, la cicatrice sérologique flavivirale, obtenue par détection des IgG en ELISA sur virus total, ainsi que le score clinique ont été déterminés. Le nombre de copies d'ARN viral a été codé arbitrairement de « 1 » à « 3 » en fonction du nombre de copies et du jour de prélèvement. Le score clinique a également été codé de « 1 » à « 3 » selon une communication personnelle de Sébastien Briolant (de Laval *et al.* 2018). La cicatrice sérologique flavivirale a été déterminée selon la réponse IgG contre les virus entiers inactivés de ZIKV et de la DENV pour les prélèvements effectués durant les 4 premiers jours après l'apparition des symptômes. Elle a été codée « 0 » pour les négatifs et « 1 » pour les positifs. Sur les 49 individus suivis, seuls 36 patients avaient plus de 4 prélèvements complètement analysés et renseignés. Ils ont été incorporés à l'étude.

b. Virus et EDIII

Les souches virales asiatique de ZIKV H/PF/2013 (Polynésie française, 2013, Numéro d'accession : KJ776791) et DENV2 (Martinique, 1998, AF208496) utilisées pour les ELISA ont été produites et fournies par le CNR des arbovirus. Les protéines recombinantes EDIII ont été produites et purifiées par l'équipe de Bruno Coutard de l'Unité des Virus Emergents à Marseille (Denis *et al.* 2019).

c. Réponse des IgM et des IgG sur virions inactivés ou sur les EDIII en ELISA

Les protocoles ELISA utilisés pour la détection des IgG sont présentés dans notre article (Denis *et al.* 2019). Afin de détecter les IgM dirigés contre les virions, des plaques 96 puits (Maxisorp, NUNC-Immuno Plate) sont sensibilisées avec des anti-IgM humaines diluées (1 :2000) (Jackson ImmunoResearch) dans du PBS et incubées toute la nuit à 4°C. Après avoir retiré les anti-IgM humaines, les plaques sont incubées avec du tampon de blocage (3% de lait et 1% d'azide de sodium dans du PBS) pendant 1 heure à température ambiante dans le noir. Après deux étapes de lavage dans du tampon de lavage (0,05% de Tween 20 dans du PBS), la plaque est incubée avec 100 µl d'échantillon humain dilué (1 :200) dans du tampon de dilution (3% de lait, 0,05% de Tween 20 et 1% d'azide de sodium dans du PBS) pendant 1

heure à 41°C. Après quatre étapes de lavage dans du tampon de lavage, les plaques sont incubées pendant 2 heures à 41°C avec les virions inactivés dilués, pour les puits de test, ou du milieu de culture dilué, pour les puits contrôles, (1 :200) dans du tampon de dilution. Après quatre étapes de lavage dans du tampon de lavage, les plaques sont incubées avec des ascites diluées (1 :1000) dans du tampon de dilution pendant 1 heure 30 à 41°C. Après quatre étapes de lavage dans du tampon de lavage, les plaques sont incubées avec un anticorps de révélation anti-IgG de souris couplé à la peroxydase de raifort (Horse-Radish Peroxydase, HRP) dilués (1 :10 000) (Jackson ImmunoResearch) dans du tampon de dilution pendant 1 heures à 41°C. Après quatre étapes de lavage dans du tampon de lavage, le substrat de la HRP (TMB, KPL, TMB microwell Peroxidase Substrate System) est ajouté et la réaction est stoppée après 10 minutes avec de l'acide sulfurique 0.25M. La densité optique (DO) est lue à 450 nm et les valeurs obtenues sont divisées par les valeurs des puits contrôles correspondants. La limite de positivité est fixée à un rDO = 3.

d. Modélisation mathématique

L'intensité de la réponse anticorps, représentée par le rDO, en fonction des jours de prélèvements ont été modélisés mathématiquement et les cinétiques sont représentées sur les graphiques. Les modèles mathématiques qui ont été utilisés sont :

- Le modèle de Wood (Wood 1967) qui a permis de modéliser la cinétique des IgM anti-ZIKV et la cinétique des IgG anti-ZEDIII de deux patients.

$$\text{(Equation 1) : } y = a \times t^b \times e^{-c \times t} + d$$

Pour chaque individu, le Jour maximum et l'Amplitude maximum sont déterminés d'après les équations 2 et 3, ci-dessous :

$$\text{(Equation 2) : Jour maximum} = \frac{b}{c}$$

$$\text{(Equation 3) : Amplitude maximum} = a \times \left(\frac{b}{c}\right)^b \times e^{-b}$$

- Le modèle cinétique qui décrit l'apparition du composé A2 dans la réaction chimique monomoléculaire successif ($A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow P$) a permis de modéliser la cinétique des IgG anti-ZEDIII. Nous l'appellerons par la suite « modèle A2 ».

$$\text{(Equation 4) : } A_2 = A_0 \times k_1 \times k_2 \times \left(\frac{e^{-k_1 t}}{(k_3 - k_2) \times (k_2 - k_1)} + \frac{e^{-k_2 t}}{(k_3 - k_2) \times (k_1 - k_2)} + \frac{e^{-k_3 t}}{(k_1 - k_3) \times (k_2 - k_3)} \right)$$

Pour chaque patient, les constantes a, b, c, d, du modèle de Wood, et A, k1, k2, k3, du modèle A2, de chaque courbe théorique ont été obtenues par ajustement de courbe. Ces

courbes théoriques ont été générées pour chaque patient puis la courbe moyenne de toutes les courbes a été calculée à partir des constantes déterminées. Les Jours où la concentration en anticorps atteignait leur maximum (J max) et les Amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant la concentration maximale d'anticorps sérique (Ampl max) ont été déterminés en utilisant le logiciel MATLAB[®] (Mathworks, r2018a, Natick, Massachusetts, USA). Les Jours de « positivation » (J pos) et de négativation (J nég) des IgM anti-ZIKV et IgG anti-ZEDIII ont été calculés lorsque la valeur devenait supérieure (J pos) ou inférieure (J nég) à 3 ou 1,54 respectivement (seuil de positivité déterminée dans Denis et al) (Denis *et al.* 2019).

e. Analyses mathématiques et statistiques

Les analyses mathématiques et statistiques ont été réalisées avec le logiciel MATLAB[®] (Mathworks, r2018a, Natick, Massachusetts, USA). Un test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour analyser la normalité de la distribution des J pos, J max, Ampl max et J nég de la cohorte et des deux groupes (1 et 2) qui en sont issus. La répartition en groupes des patients a été réalisée selon les J nég, J max et Ampl max des IgM anti-ZIKV par une méthode de partitionnement de k-moyennes (k-means) et par un modèle de mélange gaussien (Gaussian mixture model). Le test non-paramétrique Mann Whitney a été utilisé pour la comparaison des différents paramètres d'échantillons indépendants. Le test du Chi2 a permis d'analyser la répartition entre les scores de virémie et les groupes (1 et 2).

c. Résultats

L'âge moyen des patients intégrés à l'étude est de $39,8 \pm 8,4$ ans (min = 26 ans ; max = 63 ans), 12 sont des femmes et 24 sont des hommes. Douze patients présentaient une cicatrice sérologique flavivirale, 22 n'en avaient pas et 2 avaient un statut indéterminé (Table 1).

Table 1. Description de la cohorte et des différents groupes.

	Cohorte totale	Groupe 1	Groupe 2
Nombre d'individus	36	22	14
Genre, nb femmes (%) ; nb hommes (%)	12 (33%) ; 24 (67%)	9 (41%) ; 13 (59%)	3 ; 11
Age en années, moyenne ; SD ; (min-max)	39,8 ; 8,4 ; (26-63)	40,1 ; 8,8 ; (26-63)	39,4 ; 8,0 ; (29-55)
Cicatrice sérologique, nb positif (%) ; nb négatifs (%) ; nb ND (%)	12 (33%) ; 22 (61%) ; 2 (6%)	8 (36%), 13 (59%), 1 (5%)	4 (29%), 9 (64%), 1 (7%)
Score clinique, nb (%)	1, 1 (3%) ; 2, 10 (28%) ; 3, 25 (69%)	1, 1 (5%) ; 2, 7 (32%) ; 3, 14 (64%)	1, 0 (0%) ; 2, 3 (21%) ; 3, 11 (79%)
Score virémique, nb (%)	1, 8 (22%) ; 2, 10 (28%) ; 3, 7 (19%) ; ND, 11, (31%)	1, 6 (27%) ; 2, 4 (18%) ; 3, 7 (32%) ; ND, 5, (23%)	1, 2 (14%) ; 2, 6 (43%) ; 3, 0 (0%) ; ND, 6, (43%)

Abréviations : nb : nombre de patients, SD : Standard Deviation (écart-type standard), ND : Non Documenté.

Les valeurs des réponses IgM anti-ZIKV et IgG anti-ZEDIII au cours du temps pour chacun des patients ont servi pour déterminer le meilleur ajustement de courbe d'après les équations du modèle de Wood (équation 1) ou bien du modèle A2 (équation 4) respectivement. La cinétique des IgG anti-ZEDIII étant trop rapide ou observée avec un délai chez deux patients, le modèle A2 n'a pas pu être utilisé (coefficient de corrélation $R < 0,9$) et la modélisation mathématique a été réalisée avec le modèle de Wood, pour ceux-là uniquement. Aucune solution pour la résolution de la cinétique des IgG anti-ZEDIII de 8 autres patients n'a été trouvée avec les modèles mathématiques utilisés, ils n'ont donc pas été intégrés pour l'étude de la cinétique des IgG anti-ZEDIII (coefficient de corrélation $R < 0,9$). Un exemple de suivi de la cinétique de la réponse anticorps d'un patient est montré (Figure 1). D'une part, les intensités de la réponse IgM anti-DENV reste toujours inférieures à un rDO de 3 et d'autre part les intensités de réponse des IgG dirigées contre les D2EDIII et D4EDIII ne dépassent pas, non plus, leur seuil de positivité. Ces valeurs observées restent négatives. La modélisation mathématique a permis d'extrapoler des valeurs non déterminées expérimentalement entre des jours de prélèvement sanguin ou à des jours plus tardifs après les derniers prélèvements, plus de 300 jours après le début des symptômes.

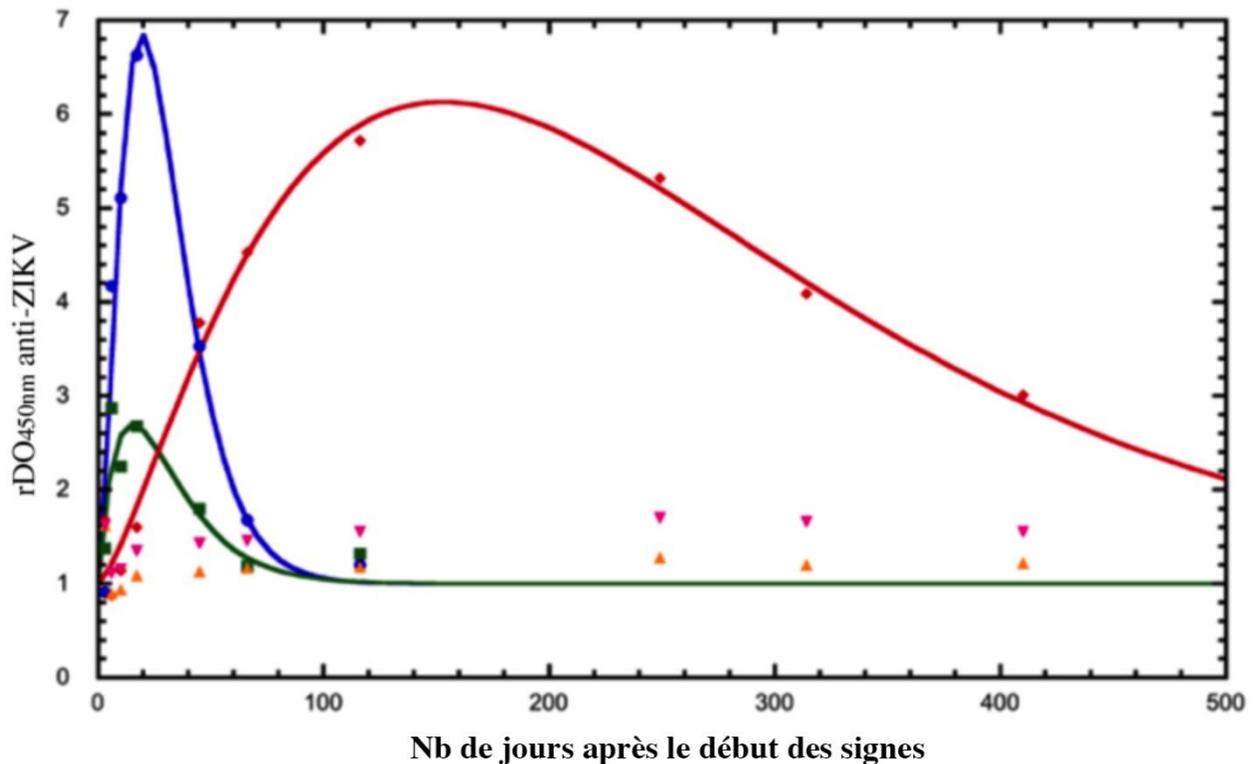


Figure 1. Valeurs expérimentales et ajustement de courbes de la réponse immunitaire humorale du patient Z032. Chaque point représente un sérum prélevé après le début des signes (en jours sur l'abscisse). Sont représentées les intensités de détection des IgM dirigées contre ZIKV (en bleu) ou DENV2 (en vert) ou des IgG dirigées contre le ZEDIII (en rouge) D2EDIII (en orange) ou D4EDIII (en rose). Le modèle de Wood a été utilisé pour modéliser les meilleurs ajustements de courbes avec, ici, les constantes $a = 0.015851$, $b = 1.8326$, $c = 0.094115$ et $d = 1$ pour la modélisation mathématique de la cinétique des IgM anti-ZIKV et $a = 0.017577$, $b = 1.4083$, $c = 0.0092013$ et $d = 1$ pour celle des IgG anti-ZEDIII.

Le jour médian où l'amplitude de réponse IgM anti-ZIKV est maximale est de 15,7 (Intervalle InterQuartile (IQR) [14.2 ; 20.6] min = 7,9 ; max = 31,6) jours après le début des symptômes (Table 2). Cette amplitude a une médiane d'intensité de $rDO = 3,8$ (IQR [3,0 ; 4,6] min = 0,6 ; max = 7,2). La distribution des jours de négativation ($rDO < 3$) des IgM anti-ZIKV des patients ne suit pas une loi normale (test de normalité de Shapiro-Wilk, p -value = 0.0024) ; le jour médian de négativation déterminé d'après les équations est de 33 (IQR [28 ; 50] min = 18 ; max = 95) jours après le début des symptômes. Cette absence de normalité peut être expliquée par une distribution bimodale des jours de négativation (Figure 2). Une analyse des jours de négativation par la méthode de partitionnement en k -moyennes ou par le modèle de mélange gaussien, chaque méthode retrouve la même répartition, ont permis de

séparer les réponses immunitaires humorales IgM anti-ZIKV des patients en deux groupes distincts dont la répartition des valeurs suit une loi normale (test de normalité de Shapiro-Wilk, groupe 1 : p-value > 0.05, groupe 2 : p-value > 0.05) (Figure 2).

Table 2. Valeurs caractéristiques des cinétiques de réponses anticorps de chaque groupe.

	Cohorte, médiane				Groupe 1, nb = 22, moyenne				Groupe 2, nb = 14, moyenne				
	nb	J pos	J max	Ampl max	J nég	J pos	J max	Ampl max	J nég	J pos	J max	Ampl max	J nég
IgM anti-ZIKV	36	5,0	15,7	3,8	33	8,0	15,8	3,5	28,6	4,0	20,2	4,6	59,5
IgG anti-ZEDIII	28	6,0	102	4,8	581	5,3	87,3	9,3	685	8,4	117	5,7	592

Abréviations : nb : nombre de patients ; J pos : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme détectable (IgM anti-ZIKV, rDO > 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO > 1,54) ; J max : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux en anticorps atteint son maximum ; Ampl max : Amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant le taux maximal d'anticorps sérique ; J nég : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme non détectable (IgM anti-ZIKV, rDO < 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO < 1,54) ; ZIKV : Virus Zika ; ZEDIII : Domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika. Les valeurs en gras représentent celles dont la différence est statistiquement significative ou présente une tendance.

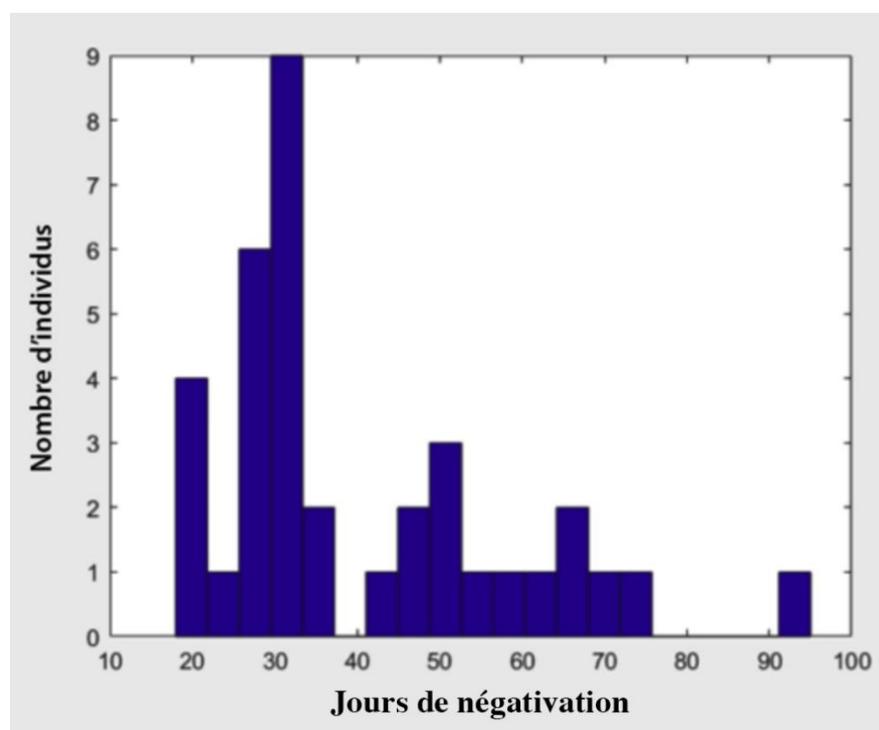


Figure 2. Jours de négativation des IgM anti-ZIKV (rDO < 3). Les deux groupes ont été

obtenus indifféremment par les méthodes de partitionnement en k-moyennes et par modèle de mélange gaussien.

Le groupe 1 est constitué de 22 patients et le groupe 2 de 14 patients, la description de ces groupes est présentée dans la table 1. Les courbes théoriques de chaque groupe, issues de la somme des équations déterminées pour chaque individu, et leurs résidus ont été déterminés (Figure 3A et 3B). Ces ajustements ont permis de déterminer les paramètres des courbes de cinétique présentés dans la table 3. Les jours où la réponse IgM est détectée positive, maximale et négative, ainsi que l'amplitude relative maximum ont été déterminés. Le jour moyen de « positivation » du groupe 1 est de 8,0 jours après le début des symptômes (Intervalle de Confiance (IC) 95% [5,3 ; 10,7]) et de 4,0 jours après le début des symptômes (IC 95% [2,0 ; 6,0]) pour le groupe 2 (test de Mann Whitney, P-value < 0,01) (Table 2). Le jour moyen de négativation du groupe 1 est de 28,6 jours après le début des symptômes (IC 95% [26,2 ; 31,1]) et de 59,5 jours après le début des symptômes (IC 95% [51,3 ; 67,7]) pour le groupe 2. Ces jours sont très significativement différents, en effet c'est sur cette base que nous les avons séparés (test de Mann Whitney, P-value < 0,001). Le jour moyen où l'amplitude de la réponse des IgM anti-ZIKV est maximale est, pour le groupe 1, de 15,8 jours après le début des symptômes (IC 95% [13,9 ; 17,2]) avec une amplitude moyenne d'intensité de rDO = 3,5 (IC 95% [3,0 ; 3,9]) et pour le groupe 2, il est de 20,2 jours après le début des symptômes (IC 95% [17,0 ; 23,5]) pour une amplitude moyenne d'intensité de rDO = 4,6 (IC 95% [3,9 ; 5,4]) (J max IgM et Ampl max IgM : test de Mann Whitney, P-value < 0,01).

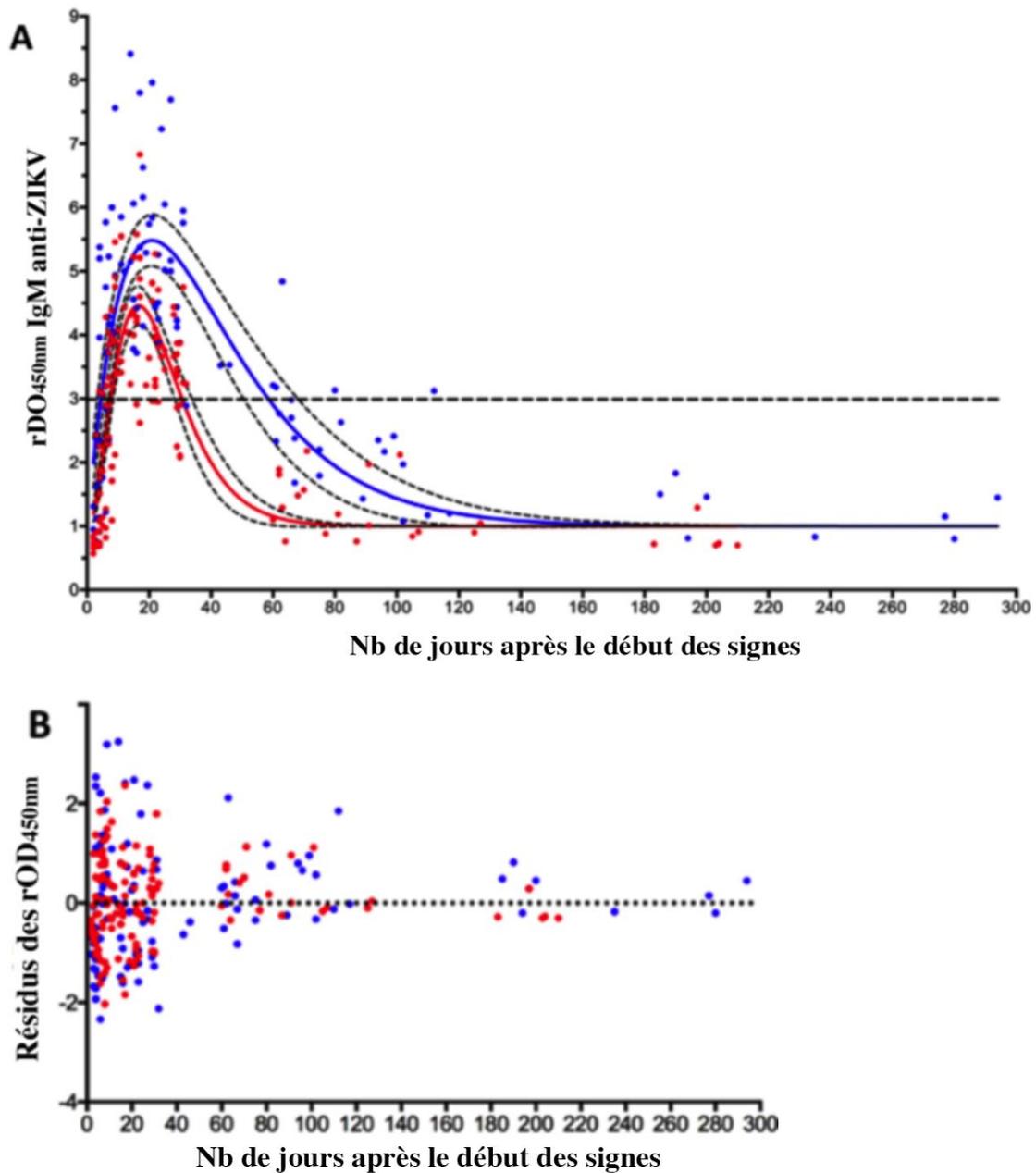


Figure 3. (A) Cinétique de détection des IgM anti-ZIKV selon les points expérimentaux. L'ajustement des courbes a été réalisé selon le modèle de Wood. Les points rouges et bleus représentent les sérums des patients du groupe 1 et 2 respectivement et les courbes rouges et bleues représentent les meilleurs ajustements selon le modèle de Wood pour les groupes 1 et 2 respectivement. En courbes pointillées sont représentés les intervalles à 95% de confiance. Le seuil $rDO = 3$ est le seuil de positivité. (B) Résidus calculés entre les valeurs observées et les valeurs estimées par le modèle de Wood pour les groupes 1 (rouge) et 2 (bleu).

Table 3. Description des échantillons de patients incorporés dans la cohorte.

N°	Genre	Age (années)	Score clinique	Cic. Séro. Flavi.	J ; Charge virale	J pos IgM	J max IgM	Ampl max IgM	J nég IgM	J pos IgG	J max IgG	Ampl max IgG	J nég IgG	Groupe
Z001	M	31	3	1	ND	11	25,5	3,5	49	7	92	3,3	1272	1
Z002	M	53	3	0	3 ; 1699 ; 6 ; 316	11	31,6	2,8	69	9	122	5,4	539	1
Z003 Z008	M	40	3	0	3 ; 6858	13	15,8	2,1	19	3	9	2,8	100	2
Z013	F	31	3	1	1 ; 6693	13	19,4	2,6	28	3	69	4,9	438	2
Z005	M	34	2	1	1 ; 2077	27	27,6	0,6	28	2	78	4,7	833	2
Z006	M	45	2	ND	3 ; 673 ; 6 ; 193	2	15,3	3,8	46	ND	109	8,6	677	1
Z007 Z009	F	59	3	1	2 ; 365	6	11,1	2,9	18	2	27	40,4	1201	2
Z010	M	35	3	0	2 ; 151	3	12,7	3,4	32	ND	ND	ND	ND	2
Z011	M	37	3	0	1 ; 52 ; 3 ; 618	8	12,7	2,6	19	5	71	3,4	271	2
Z015	F	28	3	0	4 ; 42800 ; 5 ; 16156	22	27,3	3	33	ND	ND	ND	ND	2
Z016	M	42	3	0	2 ; 3832	6	25,4	3,8	63	8	102	3,2	460	1
Z017	M	36	2	0	ND	8	16,5	3,6	30	ND	ND	ND	ND	2
Z018	F	41	3	1	ND	5	22,9	3,4	60	9	88	4,1	350	1
Z019	F	34	3	0	2 ; 744	2	20,9	5,3	74	12	124	4,6	514	1
Z020	M	42	3	1	3 ; 1980	0	7,9	4,9	42	24	232	22,6	838	1
Z021	M	29	2	0	ND	3	21,6	4,6	68	2	32	2,6	286	1
Z023	M	35	3	0	2 ; 393	3	17,4	4,4	48	ND	ND	ND	ND	1
Z024	M	26	3	ND	ND	5	14,8	4,2	33	10	85	8,2	290	2
Z025	M	29	3	0	ND	1	15,6	7	55	ND	ND	ND	ND	1
Z027	F	43	3	0	1 ; 352987	8	19,4	5,3	37	6	117	13,5	669	2
Z028	M	55	3	0	1 ; 10979	1	21,7	7,2	95	5	88	2,3	277	1
Z029	F	39	1	0	ND	4	11,2	4,5	23	ND	ND	ND	ND	2
Z030	M	39	3	0	1 ; 4155	5	19,5	5,8	49	11	149	5,7	680	1
Z031	M	39	3	1	3 ; 312	2	12,6	4,4	36	ND	ND	ND	ND	2
Z032	M	42	2	1	ND	2	19,3	4,7	65	3	138	3,4	566	1
Z035	M	46	2	0	2 ; 6334	4	14,3	4,8	32	6	125	7,4	1076	2
Z036	F	39	2	0	ND	4	14,2	3,5	31	1	123	12,2	767	2

Z037	M	46	3	0	1 ; 2340 ; 3 ; 1145	5	14,9	4,5	33	ND	ND	ND	ND	2
Z038	M	47	3	1	4 ; 8807	9	17,2	2,9	29	2	40	6,2	241	2
Z039	M	41	2	1	2 ; 370	5	14,4	3,2	32	8	181	21,4	1661	2
Z040	F	63	3	0	3 ; 8770	7	15,3	3,7	27	8	135	5,8	625	2
Z044	M	44	2	0	2 ; 323	5	15,4	3,6	33	ND	25	4,7	1936	2
Z045	F	32	3	0	1 ; 22187 ; 3 ; 1180	5	13,8	4,5	29	7	85	2,9	362	2
Z046	M	35	2	1	ND	6	12,4	3	21	5	102	4,4	616	2
Z047	F	41	3	1	2 ; 12191	6	14,3	3,7	27	11	125	5,3	902	2
Z048	F	35	3	0	1 ; 2369	4	18,8	3,8	50	2	133	2,4	446	1

Abréviations : N° : numéro ; Cic. Séro. Flavi. : Cicatrice Sérologique flavivirale ; J (charge virale) : Nombre de jours après le début des symptômes du prélèvement ; J pos IgM ou IgG : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme détectable (IgM anti-ZIKV, rDO > 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO > 1,54) ; J max : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux en anticorps atteint son maximum ; Ampl max : Amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant le taux maximal d'anticorps sérique ; J nég : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme non détectable (IgM anti-ZIKV, rDO < 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO < 1,54) ; M : Masculin ; F : Féminin ; ND : non documenté.

Les courbes de cinétiques des IgG anti-ZEDIII de ces deux groupes ont été tracées et leurs paramètres ont été déterminés (Table 2). Les IgG anti-ZEDIII positivent (rDO > 1,54) en moyenne 5,3 jours après le début des symptômes (IC 95% [3,5 ; 7,0]) pour le groupe 1 et 8,4 jours après le début des symptômes (IC 95% [4,2 ; 12,6]) pour le groupe 2 (test de Mann Whitney, P-value = 0,15). Le nombre moyen de jours de négativation des IgG anti-ZEDIII (rDO < 1,54) est de 685 jours après le début des symptômes (IC 95% [448 ; 922]) pour le groupe 1 et de 592 jours après le début des symptômes (IC 95% [411 ; 774]) pour le groupe 2 (test de Mann Whitney, P-value = 0,52). Le jour moyen où l'amplitude de l'intensité de réponse des IgG anti-ZEDIII est maximale est de 87,3 jours après le début des symptômes (IC 95% [62,4 ; 112,3]) avec une amplitude moyenne d'intensité de rDO = 9,3 (IC 95% [4,1 ; 14,4]) pour le groupe 1. Pour le groupe 2 il est de 117,4 jours après le début des symptômes (IC 95% [87,2 ; 147,6]) pour une amplitude moyenne d'intensité de rDO = 5,7 (IC 95% [2,1 ; 9,3]) (Figure 4). Le jour où l'amplitude de l'intensité de réponse des IgG anti-ZEDIII est maximale ainsi que cette amplitude ont une tendance à être différente (test de Mann Whitney, U = 59,5, P-value = 0,09 et U = 57, P-value = 0,07, respectivement) entre ces deux groupes mais les jours de négativation entre les deux groupes (685 et 592 jours pour le groupe 1 et 2, respectivement) ne sont pas statistiquement différents. Par ailleurs le groupe 1, pour lequel le jour de négativation des IgM anti-ZIKV est plus précoce (28,6 jours après l'apparition des symptômes) avec une détection des IgG plus précoce que le groupe 2, est préférentiellement associé à une forte virémie (test du Chi2, P-value < 0,05).

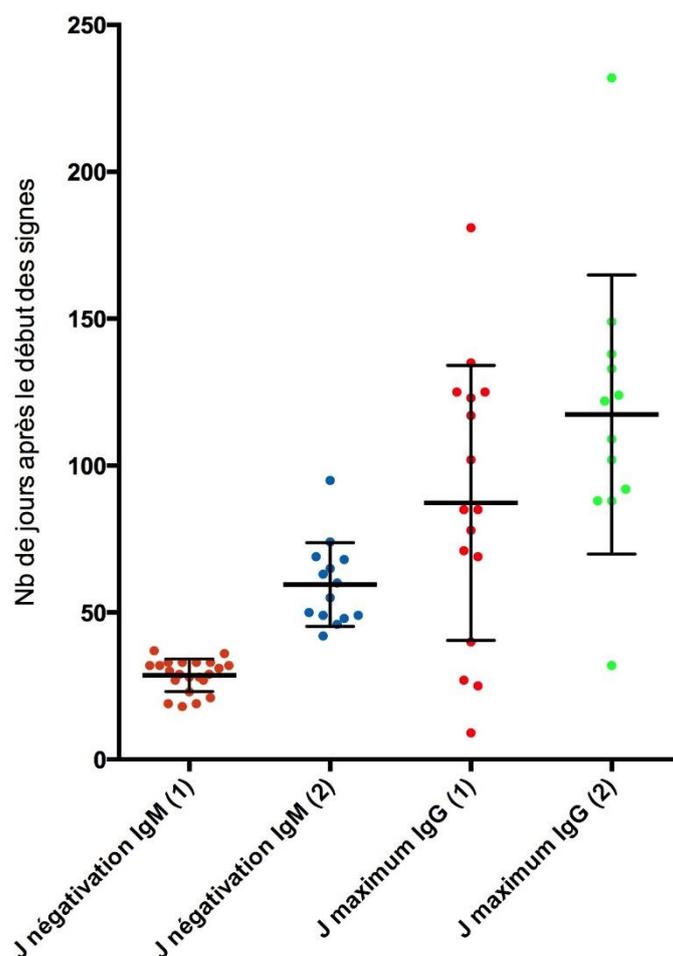


Figure 4. Répartitions des jours de négativation des IgM anti-ZIKV des deux groupes statistiquement différents et des jours où l'intensité de réponse des IgG anti-ZEDIII est maximale issue des deux groupes IgM. Moyenne des jours de négativation des IgM et déviation standard, en rouge pour le groupe 1 et en bleu pour le groupe 2. Moyenne des jours présentant le maximum d'intensité pour les IgG et déviation standard, en rouge pour le groupe 1 et en vert pour le groupe 2.

Par ailleurs, nous avons également déterminé ces paramètres pour chacun des groupes de patients séparés cette fois ci, selon la présence ou l'absence d'une cicatrice sérologique aux *Flavivirus* d'une part, et leur score clinique (1 et 2, ou 3) d'autre part. Tout d'abord, le jour de négativation des IgG des patients ne présentant pas de cicatrice sérologique aux *Flavivirus* est inférieur (J nég médian = 538) à ceux qui présentent une cicatrice sérologique (J nég médian = 847) (Table 4 et Figure 5). Cette différence n'est pas significative mais présente une tendance (U = 45, P-value = 0,079). Lorsque l'on analyse les groupes séparés selon le score clinique (Table 5 et Figure 6), on observe que les jours où positivent les IgG anti-ZEDIII sont

significativement différents (médianes : J pos (1 ; 2) = 3,0 ; J pos (3) = 7,0 ; U = 31,5, P-value < 0,05) entre les 2 groupes. De plus, la médiane des jours de négatation de ces groupes a tendance à être différente (J nég (1/2) = 734 ; J nég (3) = 475 ; U = 42, P-value = 0,071).

Table 4. Valeurs caractéristiques des cinétiques de réponses anticorps de chaque groupe séparé selon leur cicatrice sérologique.

	Cicatrice sérologique négative, nb = 22				Cicatrice sérologique positive, nb = 12			
	J pos	J max	Ampl max	J nég	J pos	J max	Ampl max	J nég
IgM anti-ZIKV	4,0	16,5	3,8	33,0	6,0	15,8	3,3	30,5
IQR	[3,0 ; 8,0]	[14,9 ; 20,9]	[3,4 ; 5,3]	[30,0 ; 55,0]	[2,8 ; 10,5]	[12,5 ; 22,0]	[2,9 ; 4,2]	[27,3 ; 47,3]
IgG anti-ZEDIII	5,5	123	5,0	538	5,0	92,0	4,9	847
IQR	[2,3 ; 8,8]	[95,3 ; 131]	[2,5 ; 10,6]	[332 ; 669]	[2,0 ; 9,0]	[69,0 ; 138,0]	[4,1 ; 21,4]	[450 ; 1221]

Abréviations : nb : nombre de patients ; J pos : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme détectable (IgM anti-ZIKV, rDO > 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO > 1,54) ; J max : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux en anticorps atteint son maximum ; Ampl max : Amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant le taux maximal d'anticorps sériques ; J nég : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme non détectable (IgM anti-ZIKV, rDO < 3 ; IgG anti-ZEDIII, rDO < 1,54) ; ZIKV : Virus Zika ; ZEDIII : Domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika ; IQR : Intervalle interquartile. Sont présentées les médianes des valeurs avec l'intervalle interquartile. Les valeurs en gras représentent celles dont la différence est statistiquement significative ou présente une tendance.

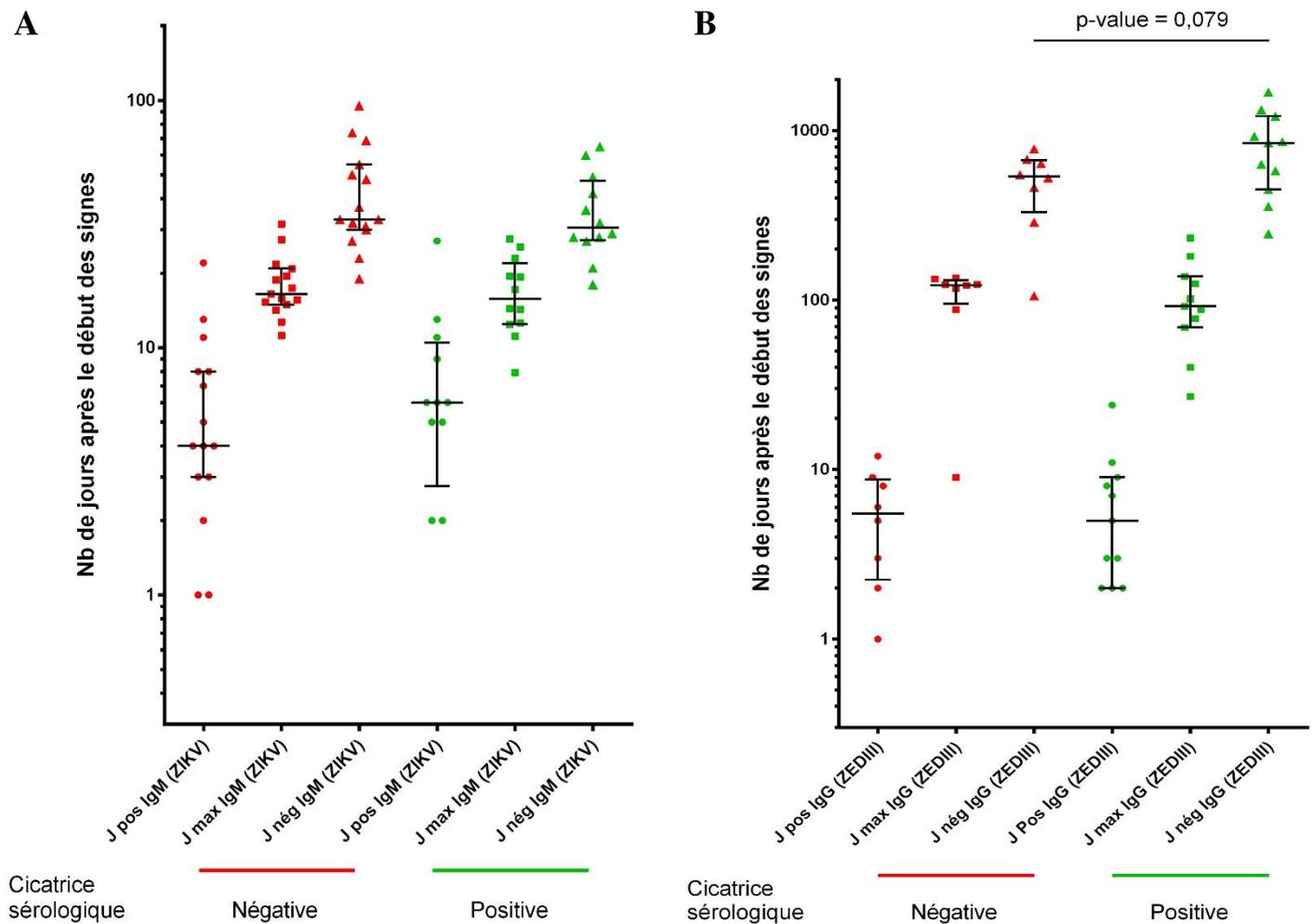


Figure 5. Valeurs caractéristiques des cinétiques de réponses IgM anti-ZIKV (A) et IgG anti-ZEDIII (B) de chaque groupe séparé selon leur cicatrice sérologique. Sont représentées les médianes des valeurs et leur intervalle interquartile en rouge pour les patients ne présentant pas de cicatrice sérologique flavivirale et en vert ceux présentant une cicatrice sérologique flavivirale.

Table 5. Valeurs caractéristiques des cinétiques de réponses anticorps de chaque groupe séparé selon leur score clinique.

	Score clinique = 1 ou 2, nb = 11				Score clinique = 3, nb = 25			
	J pos	J max	Ampl max	J nég	J pos	J max	Ampl max	J nég
IgM anti-ZIKV	4,0	15,3	3,6	32,0	5	17,2	3,8	36,0
IQR	[3,0 ; 6,0]	[14,2 ; 19,3]	[3,2 ; 4,6]	[28,0 ; 46,0]	[3,0 ; 8,5]	[14,1 ; 21,3]	[3,0 ; 4,7]	[28,5 ; 52,5]
IgG anti-ZEDIII	3,0	109	4,7	735	7,0	92,0	4,9	475
IQR	[2,0 ; 6,0]	[55,0 ; 131,5]	[3,9 ; 10,4]	[594 ; 1042]	[3,0 ; 10,0]	[71,0 ; 125,0]	[3,2 ; 6,2]	[294 ; 693]

Abréviations : nb : nombre de patients ; J pos : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme détectable (IgM anti-ZIKV, rDO > 3 ;

IgG anti-ZEDIII, $rDO > 1,54$) ; J max : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux en anticorps atteint son maximum ; Ampl max : Amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant le taux maximal d'anticorps sérique ; J nég : Nombre de Jours après le début des symptômes où le taux d'anticorps est considéré comme non détectable (IgM anti-ZIKV, $rDO < 3$; IgG anti-ZEDIII, $rDO < 1,54$) ; ZIKV : Virus Zika ; ZEDIII : Domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika ; IQR : Intervalle interquartile. Sont présentées les médianes des valeurs avec l'intervalle interquartile. Les valeurs en gras représentent celles dont la différence est statistiquement significative ou présente une tendance.

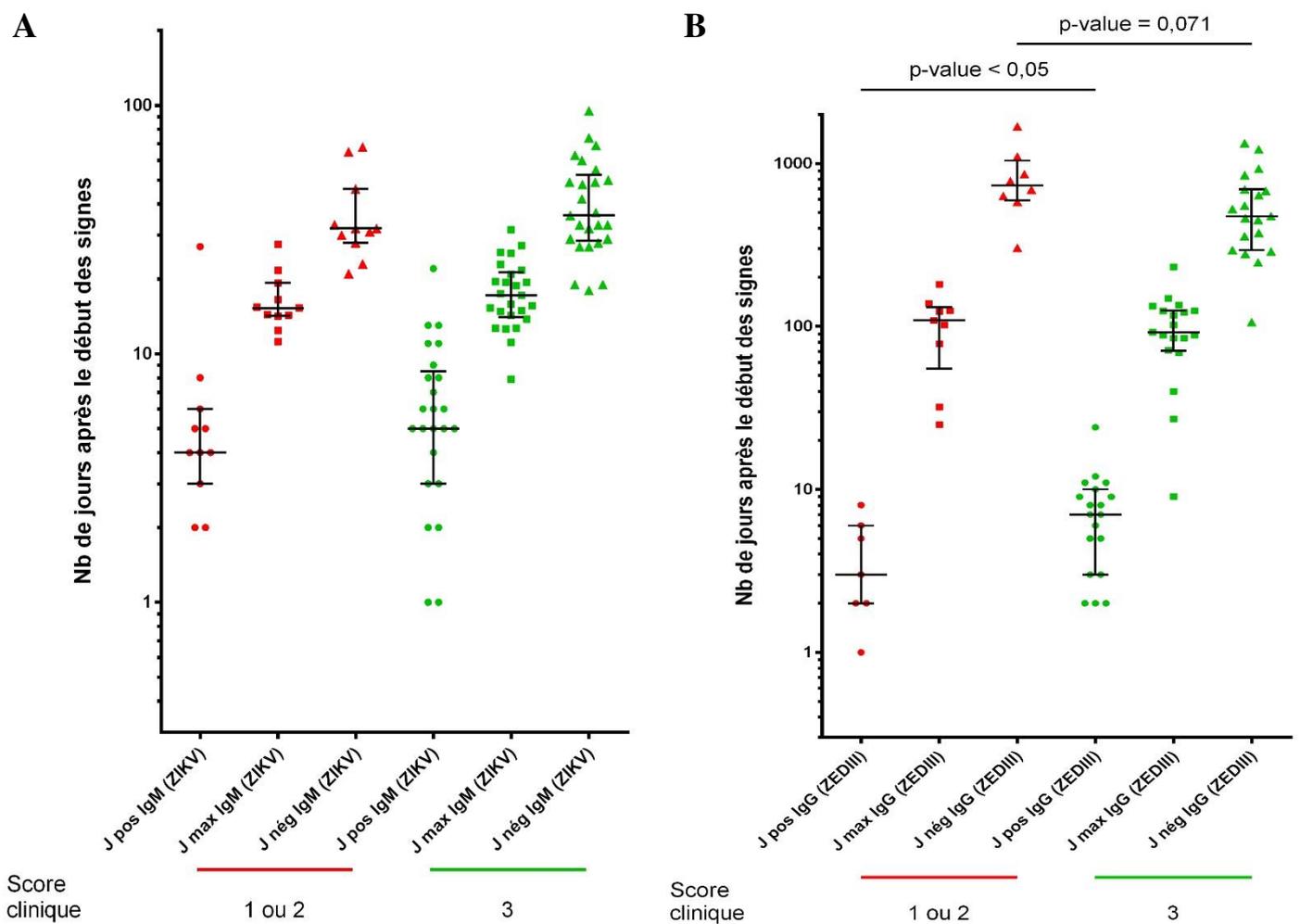


Figure 6. Valeurs caractéristiques des cinétiques de réponses IgM anti-ZIKV (**A**) et IgG anti-ZEDIII (**B**) de chaque groupe séparé selon leur score clinique. Sont représentées les médianes des valeurs et leur intervalle interquartile en rouge pour les patients présentant un score clinique de 1 ou de 2 et en vert ceux présentant un score clinique de 3.

d. Discussion

L'utilisation du ZEDIII comme cible de diagnostic a montré son intérêt. Cet outil de détection, semi quantitatif nous permet d'apprécier le taux d'IgG anti-ZEDIII présent dans les sérums. Sa fiabilité caractérisée par sa sensibilité, sa spécificité et sa reproductibilité sur plusieurs cohortes ainsi que son aspect semi-quantitatif permettent d'obtenir des données expérimentales solides. Cet outil couplé à une cohorte de patients dont le suivi clinique et immunitaire est bien caractérisé ont permis de modéliser des courbes de cinétique à l'aide de modèles mathématiques pertinents le plus fidèlement possible aux résultats expérimentaux. A l'aide de ces modèles mathématiques, les jours où la concentration en anticorps atteignaient leur maximum, les amplitudes maximales de réponse en ELISA reflétant la concentration maximale d'anticorps sériques et les jours de « positivation » et de négativation des IgM anti-ZIKV et IgG anti-ZEDIII lorsque la valeur devenait supérieure et inférieure à un $rDO = 3$ ou $1,54$ respectivement (seuil de positivité déterminé dans Denis et al) (Denis *et al.* 2019) ont été extrapolés. Le test n'étant que semi-quantitatif, les amplitudes ne restent que relatives. En revanche, les jours de « positivation », de négativation et les jours où la concentration en anticorps atteignaient leur maximum sont fiables.

L'analyse des jours de négativation des IgM anti-ZIKV met en lumière l'existence de 2 groupes : les cinétiques des IgG anti-ZEDIII séparées selon ce critère présentent des jours où leur taux atteint un maximum avec une tendance à être différent (87,3 jours après le début des symptômes pour le groupe 1 et 117 jours après le début des symptômes pour le groupe 2). A cette information nous avons intégré les statuts de la cicatrice sérologique (présence = 1 ; absence = 0), le score clinique (de 1 à 3) ainsi que le score de la virémie (de 1 à 3). Il s'avère qu'une plus forte virémie est associée au groupe 1 (χ^2 ; P-value < 0,05) : lorsque les IgM négativent plus tôt (28,6 jours versus 59,5 jours) et que les IgG positivent plus rapidement (5,3 jours versus 8,4 jours) avec une plus forte amplitude relative ($rDO = 9,2$ versus $rDO = 5,7$) atteinte plus rapidement (87,3 jours versus 117 jours).

De plus, lorsque les patients présentent une cicatrice sérologique positive, l'apparition des IgG est plus rapide, bien que non statistiquement différente et leurs IgG anti-ZEDIII disparaissent tardivement, après 847 jours après le début des symptômes. Les patients qui ont un score clinique plus élevé ont des IgG qui positivent tardivement (J pos = 7,0) et finissent précocement (J nég = 475) comparé au groupe qui a un score clinique plus faible (J pos = 3,0 ; J nég = 734).

Dans la littérature, différents profils de réponse immunitaire ont déjà été observés. Des patients présentant une cicatrice sérologique due à une infection primaire par un *Flavivirus* développent un profil de réponse immunitaire de seconde infection caractérisée par une faible ou une absence de production d'IgM spécifiques de ZIKV mais avec une production très rapide et un fort taux d'IgG dirigés contre ZIKV. Ce profil est plus retrouvé chez les patients vivants en zones de co-circulation flavivirales (Barzon *et al.* 2018 ; Ohst *et al.* 2018; Steinhagen *et al.* 2016). En effet notre étude fait ressortir des tendances de corrélation entre les profils de réponse immunitaire et le statut immunitaire flaviviral pré-existant ou le score clinique. Les profils que l'on observe, lorsque l'on sépare selon les jours de négativation des IgM anti-ZIKV, la cicatrice sérologique flavivirale ou le score clinique, s'apparentent tous à ces deux profils de réponse immunitaire précédemment décrits. Ce manque de corrélation franche pourrait être expliqué par une mauvaise classification de la cicatrice sérologique et des scores cliniques de quelques patients. En effet, nous manquons d'information épidémiologique et la fiabilité du test permettant d'évaluer la cicatrice sérologique est incertaine. Par exemple, seul un patient a un score clinique de 1, cette classification hétérogène n'est donc pas optimale. De plus, le faible nombre de patients dans les groupes est à l'origine d'un manque de puissance dans notre étude.

Ces résultats doivent être consolidés en réalisant une classification des scores cliniques, de virémie et de la cicatrice sérologique plus homogènes et plus pertinente notamment en réalisant une séroneutralisation de plusieurs *Flavivirus* avec les premiers prélèvements des patients.

Ces travaux nous ont permis d'estimer que la détection des IgM anti-ZIKV avec l'ELISA du CNR est fiable à partir de 5 jours et jusqu'à 1 mois après l'apparition des symptômes et entre 6 jours et jusqu'à environ un an et 7 mois pour la détection des IgG anti-ZEDIII en fonction des groupes.

Les IgG dirigées contre le ZEDIII sont connues pour être des anticorps neutralisants ZIKV (Magnani *et al.* 2017 ; Stettler *et al.* 2016 ; Wang *et al.* 2016b ; Wu *et al.* 2017 ; Yu *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2016) il serait donc intéressant d'étudier la cinétique d'apparition et de disparition de ces anticorps neutralisants et de la comparer à la cinétique des IgG anti-ZEDIII. De plus, les anticorps anti-ZIKV initialement induits par une ancienne infection DENV, sont capables de réaliser une réaction croisée (Bhaumik *et al.* 2018; Rogers *et al.* 2017) potentiellement neutralisante (Robbiani *et al.* 2017) ou facilitante (Rogers *et al.* 2017). Nous

observons dans notre essai que le groupe 1, séparé sur la base des jours de négativation des IgM anti-ZIKV, est caractérisé par une réponse IgM anti-ZIKV plus transitoire que le groupe 2 et une réponse IgG anti-ZEDIII plus rapide, plus intense, plus étendue et préférentiellement associé à une virémie plus importante. Ce profil ressemblant à un profil de réponse immunitaire d'une seconde infection potentiellement associé à une facilitation par les anticorps (ADE). Afin d'étudier cette possibilité, des études de neutralisation et de facilitation d'infection sur différents *Flavivirus* entre ces deux groupes serait à envisager.

Grâce au traitement mathématique et une cohorte d'Hommes suivis pendant plus d'un an, nous avons pu déterminer par extrapolation sur nos données expérimentales (a) le jour où le taux d'anticorps détectable dans le sérum devient positif, (b) où il atteint son maximum, (c) où il devient négatif ainsi que (d) son amplitude maximale associée. Ceci présente un grand intérêt notamment pour la validation de la fenêtre d'utilisation de notre sérodiagnostic.

e. Contribution des auteurs

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Damien Claverie de l'unité de Neurophysiologie du Stress à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées.

Acquisition des résultats : Jessica Denis

Modélisation mathématique : Cyril Badaut

Analyses *in silico* : Damien Claverie

Interprétation des résultats : Cyril Badaut, Damien Claverie, Jessica Denis

Rédaction : Cyril Badaut, Jessica Denis

II. Etude du pouvoir protecteur des anticorps induits par immunisation de souris AG129 avec le EDIII de ZIKV

1. Introduction

Face aux différentes complications neurologiques pouvant être engendrées par une infection ZIKV chez l'Homme et dans un contexte de co-endémie avec une séroprévalence flavivirale fréquente augmentant le risque d'ADE, le développement d'un vaccin est une question de santé publique majeure.

Le ZEDIII se présente comme une cible spécifique des anticorps neutralisant du virus (Sapparapu *et al.* 2016 ; Stettler *et al.* 2016). Ces anticorps sont également capables de

protéger les souris face à une épreuve infectieuse létale de ZIKV et de ne pas provoquer d'ADE sur la DENV (Stettler *et al.* 2016 ; Zhao *et al.* 2016). Ces résultats obtenus avec des anticorps monoclonaux sont confirmés par une immunisation de souris C57BL/6 avec le ZEDIII. En effet, elle induit des anticorps spécifiques et neutralisants à un titre supérieur à la limite conférant une protection immunitaire face à une infection ZIKV (titre permettant 50% de neutralisation >10). Cependant une protection face à une épreuve infectieuse létale n'a pas été montrée (Yang *et al.* 2017).

Lorsqu'une réponse immunitaire se met en place, les antigènes sont présentés à la membrane des Cellules Présentatrice d'Antigènes (CPA) via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH-II). Ainsi elles peuvent induire, en plus d'une réponse immunitaire humorale, une réponse immunitaire cellulaire en activant les lymphocytes T CD4+ auxiliaires qui sont nécessaires pour induire une mémoire immunitaire. Les CPA qui présentent les antigènes sur les CMH-I (présentation croisée) activent les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques nécessaires contre les infections virales (Bergmann-Leitner *et al.* 2014). Les adjuvants standards, et notamment l'alun, ont largement et historiquement été utilisés dans le cadre de la vaccination mais présentent certaines limites, notamment leur manque d'efficacité concernant certains antigènes. En effet, cet adjuvant est capable d'induire une réponse immunitaire humorale mais l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire de type T CD8+ est plus limitée. Pour cette raison la recherche sur des adjuvants innovants est encouragée (Bergmann-Leitner *et al.* 2014 ; Pavot *et al.* 2014).

Les nanoparticules Poly Lactic Acid (PLA) sont des biomatériaux polymères, biodégradables et biocompatibles, déjà autorisés pour l'utilisation chez l'homme et approuvés par la Food and Drug Administration (FDA). Elles induisent une forte réponse immunitaire humorale fonctionnelle dès la première administration, comparable à celles obtenues avec les adjuvants standards (alun, MF59 ou Freund) et ainsi stimulent la réponse immunitaire cellulaire. De plus, ces nanoparticules entraînent la libération des antigènes sur une période prolongée stimulant ainsi le système immunitaire sur la durée. Ceci pourrait diminuer le risque d'intolérance et la nécessité des rappels dans le schéma vaccinal (Danhier *et al.* 2012 ; Pavot *et al.* 2014). Cette stimulation prolongée est également propice au développement d'une réponse immunitaire cellulaire des lymphocytes T CD8+ en augmentant la présentation croisée des antigènes chez les Cellules Présentatrice d'Antigènes (CPA) (Bergmann-Leitner *et al.* 2014).

Dans ce contexte nous proposons donc d'étudier le pouvoir protecteur des anticorps et de la réponse immunitaire cellulaire induite par ZEDIII lors d'immunisation chez la souris. La protéine recombinante ZEDIII, proposée comme base vaccinale, adsorbée à la surface de nanoparticules PLA a été administrée à des souris AG129, un modèle d'étude murin pour les infections à ZIKV (Bradley *et al.* 2017). Afin de comparer l'effet de la formulation PLA-ZEDIII à une immunisation par ZEDIII, PLA ou PBS nous avons suivi l'apparition des anticorps dirigés contre le ZEDIII au cours du temps, étudié leur capacité de séroneutralisation *in vitro* et leur capacité de protection face à une épreuve infectieuse létale *in vivo*. Des analyses d'immunohistochimie sur différents organes nous permettront d'apprécier de potentielles différences de protection des tissus entre les différents groupes et le dosage des cytokines nous permettra d'étudier également le profil de réponse immunitaire cellulaire stimulé par les nanoparticules.

2. Matériel et méthodes

a. Modèle animal et déclaration éthique

Cet essai a été réalisé sur des souris femelles AG129, pour lesquelles les gènes des récepteurs aux interférons de type I (α et β) et de type II (γ) sont inactivés, âgées de 6 à 10 semaines. Les souris ont été hébergées dans les animaleries de l'Institut Pasteur accréditées par les services vétérinaires de la Préfecture de Police de Paris. Les procédures ont été réalisées conformément aux réglementations françaises et européennes relatives aux soins et à la protection des animaux de laboratoires. Le protocole d'expérimentation a été approuvé par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de l'Institut Pasteur (CETEA n°89 – Institut Pasteur) et par le ministère français de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI 0762.02). L'état des souris était surveillé tous les jours ; posture, apparence générale, consommation alimentaire et hydrique, perte et gain de poids, ainsi que le comportement naturel et provoqué. Les animaux qui présentaient des symptômes sévères comme une perte de poids >20%, une extrême léthargie et/ou paralysie étaient sacrifiés en accord avec les points limites fixés pour l'étude. Un complément alimentaire, DietGel®, était disposé au fond des cages après infection leur permettant de s'alimenter et de s'hydrater. Le sacrifice des souris a été effectué par dislocation des cervicales ou perfusion intracardiaque de PBS, lors de prélèvement d'organes, après anesthésie profonde par un mélange de ketamine/xylazine injectable.

b. Cellules, virus, EDIII et nanoparticules de Poly Lactic Acid

Les cellules Vero E6, cellules épithéliales rénales de primates, ont été cultivées dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) contenant 5% de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, FBS) à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. La souche virale asiatique de ZIKV H/PF/2013 (Polynésie française, 2013, Numéro d'accès : KJ776791), utilisée pour l'épreuve infectieuse a été produite et fournie par l'équipe d'Etienne Simon-Lorière de l'Institut Pasteur de Paris tandis que celle utilisée pour les essais de séroneutralisation et ELISA a été produite et fournie par le CNR des arbovirus. La souche virale de DENV4 utilisée pour les essais de séroneutralisation, isolée en 2014 en Martinique, a été produite et fournie par le CNR des arbovirus. La production et la purification des protéines recombinantes EDIII sont décrites dans notre article (Denis *et al.* 2019). Les PLA et les formulations PLA-ZEDIII ont été effectuées par le laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique dirigé par Bernard Verrier à Lyon, France (Jawinski *et al.* 2019).

c. Détermination de la dose virale pour l'épreuve infectieuse

L'injection de différentes doses de ZIKV H/PF/2013 à 6 souris a permis de déterminer la dose à injecter lors de l'épreuve infectieuse. Une (n=3) ou dix (n=3) PFU de ZIKV dilué en PBS/BSA 0,2% ont été injectées en sous-cutané au niveau des ganglions inguinaux aux souris alors âgées de 13 à 17 semaines. Les souris étaient surveillées jusqu'à leur sacrifice comme décrit dans le paragraphe « Modèle animal et déclaration éthique ».

d. Schéma d'immunisation

Les souris ont été immunisées à J0 puis à J21 et J42 (Knudsen *et al.* 2016) avec soit la formulation nanoparticules PLA-ZEDIII (n=8), le ZEDIII (n=8), les nanoparticules PLA (n=4), ou du PBS (n=4). Une quantité de 10µg de ZEDIII +/- 0,5% de PLA dans un volume final de 100µl ont été injectés par immunisation en sous-cutanée au niveau des ganglions inguinaux. Des prises de sang dans des tubes contenant de l'EDTA ont été réalisées à J-1, J20 et J41, le sang a été centrifugé à 1300 g pendant 10 minutes à 4°C afin de récupérer et conserver le plasma pour des tests ELISA. D'autres prises de sang dans des tubes contenant de l'EDTA ont été effectuées à J49, J56, J63 et J68. Un volume de 20µl de sang du prélèvement J68 est conservé pour chaque souris dans du tampon de lyse pour une future extraction de l'ARN et un dosage de la virémie par RT-qPCR. Après centrifugation du sang, le plasma est conservé pour de futures analyses de séroneutralisation, d'ELISA et un dosage

des cytokines. A J71 les souris sont soumises à une épreuve infectieuse avec 10 PFU de la souche Asiatique H/PF/2013 de ZIKV diluée en PBS/BSA 0,2%. A J73, 20µl de sang sont prélevés sur tube EDTA et conservés dans du tampon de lyse pour une future extraction ARN et un dosage de la virémie par RT-qPCR. A J75 une souris par groupe est sacrifiée ; le cerveau, les yeux, la rate, les ganglions inguinaux, le foie et les reins sont prélevés pour une analyse anatomopathologique et immunohistologique. Une prise de sang sur EDTA est réalisée sur les autres souris, 20µl de sang sont conservés dans du tampon de lyse pour une future extraction ARN et un dosage de la virémie par RT-qPCR. Après centrifugation du sang, le plasma est conservé pour un dosage des cytokines. Des prises de sang sur EDTA sont de nouveau effectuées à J76, J77, J79, J81, J83 et J85, 20µl de sang sont conservés dans du tampon de lyse pour une future extraction ARN et un dosage de la virémie par RT-qPCR. Les souris étaient surveillées jusqu'à leur sacrifice comme décrits dans le paragraphe « Modèle animal et déclaration éthique ». Le schéma d'immunisation et l'ensemble des analyses est résumé dans la figure 1.

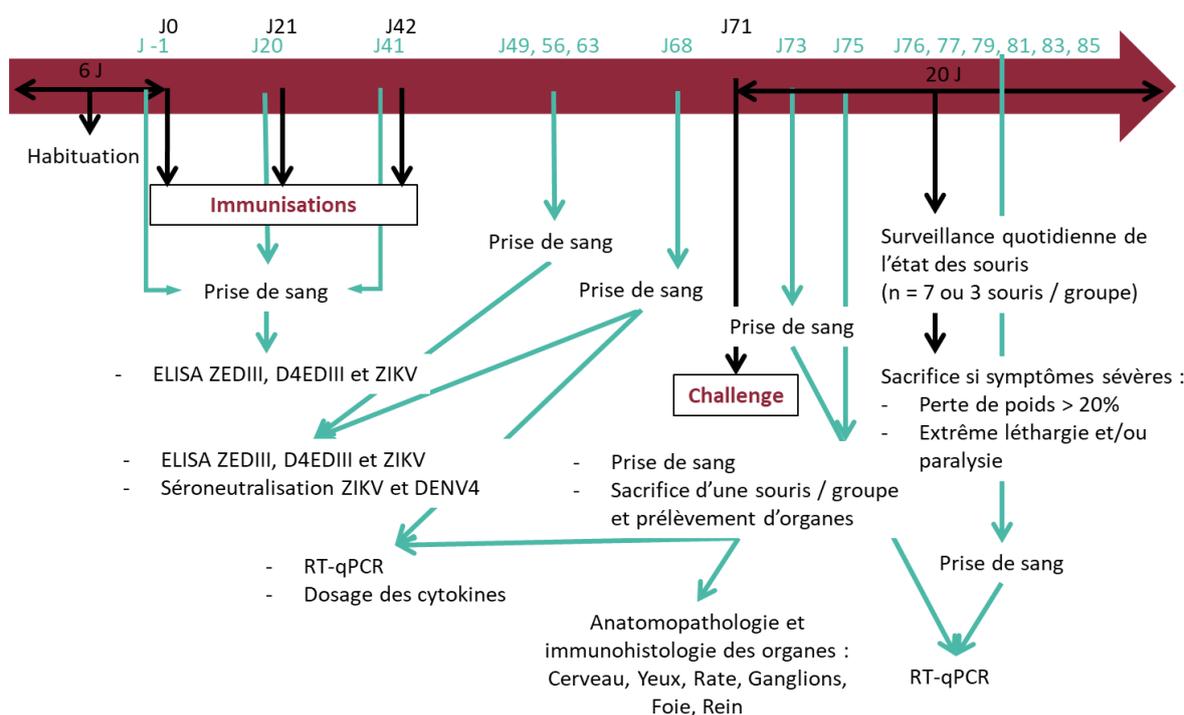


Figure 1. Schéma d'immunisation des souris AG129 et de l'analyse des différents prélèvements. Quatre groupes de souris ont été immunisés en sous-cutanée au niveau des ganglions inguinaux avec (i) la formulation nanoparticules PLA-ZEDIII (n=8), (ii) le ZEDIII (n=8), (iii) les nanoparticules PLA (n=4) ou (iiii) du PBS (n=4).

e. Conservation des organes

Les souris sont anesthésiées par injection de ketamine/xylazine puis une perfusion intracardiaque de PBS 1X stérile est réalisée. Les organes sont collectés et placés à 4°C dans une solution de formol à 10% (Sigma, HT5011) pendant 3 jours puis sont transférés dans une solution d'éthanol à 70% et conservés à 4°C jusqu'au traitement en histologie.

f. Quantification de la virémie par RT-qPCR

Le protocole de RT-qPCR utilisé est publié dans l'article de Ryckebusch *et al.*. Brièvement, une séquence de 101 pb située dans le gène NS5, entre les nucléotides 9419 et 9318, est amplifiée. Les amorces utilisées sont 5'-AAGTACACATACCAAAACAAAGTG-3' (forward) et 5'-TCCGCTCCCCCTTTGGTCTTG-3' (reverse). Le kit Power SYBR Green RNA-to-Ct One-Step (Applied Biosystems) est utilisé selon les procédures recommandées par le fabricant. L'amplification est réalisée avec un appareil Applied Biosystems 7500. Dans un premier temps, l'ARN viral est rétro-transcrit par la transcriptase inverse (30 min, 48°C) puis la transcriptase inverse est inactivée et l'ADN polymérase activée (10 min, 95°C). 40 cycles d'amplification (15 sec, 95°C puis 1 min, 60°C) sont réalisés et la fluorescence enregistrée (Ryckebusch *et al.* 2017). Le programme se termine par une dénaturation progressive de 60°C à 95°C en 20 minutes puis 15 secondes à 95°C. Un report des valeurs de Ct des échantillons sur la courbe d'étalonnage des standards permet de déterminer la quantité de copies d'ARN/mL.

g. Réponse des IgG des souris immunisées aux EDIII en ELISA

Le protocole utilisé est présenté dans notre article (Denis *et al.* 2019). Deux modifications ont été apportées : une sur la dilution des plasmas de souris dilués au 1 :50, et le temps de révélation, fixé à 15 minutes. La limite de positivité est calculée pour chaque cible selon l'équation $m + 3\sigma$ (m = moyenne, σ = écart-type, α (erreur) = 1%) sur les rDO des échantillons avant immunisation (J-1).

h. Réponse des IgG des souris immunisées à ZIKV en ELISA

Le protocole ELISA utilisé pour la détection des IgG anti-ZIKV est présenté dans notre article (Denis *et al.* 2019). Les plasmas de souris sont dilués au 1 :50 et un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase (Sigma-Aldrich) dilué (1 :40 000) est utilisé. La limite de

positivité est calculée pour chaque cible selon l'équation $m + 3\sigma$ (m = moyenne, σ = écart-type, α (erreur) = 1%) sur les rDO des échantillons avant immunisation (J-1).

i. Test de séroneutralisation des virus ZIKV et DENV4

Les sérums sont rassemblés et filtrés sur des filtres 0,2 μ puis dilués en série dans du milieu de culture DMEM 0% FBS. Les différentes dilutions de sérums regroupés sont mises en contact volume à volume avec le virus ($10^{2,8}$ TCID₅₀/ml) et incubés pendant 1 heure à 37°C. 100 μ l des mélanges sont ensuite ensemencés en dupliqua dans des plaques 96 puits ensemencées de cellules Vero puis incubés pendant 2 heures à 37°C. Un volume de 100 μ l de milieu de culture DMEM 2% FBS est ajouté dans les puits puis la plaque est incubée à 37°C pendant 3,5 jours pour le test de séroneutralisation de ZIKV et 7 jours pour la DENV4. La cytotoxicité du sérum et le titre des virus utilisés sont vérifiés en parallèle. La lecture des plaques s'effectue au microscope par l'absence ou la présence d'Effets CytoPathologiques (ECP) et le titre de séroneutralisation est considéré comme étant la dernière dilution avant la visualisation des ECP.

j. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec Prism 6 (GraphPad, version 6.07) et Statistica (TIBCO, version 13.5). Les courbes de survie Kaplan-Meier ont été analysées avec le test du Log-rank. Des ANOVA à mesures répétées avec un alpha de 0,05 bilatéral ont été utilisées pour étudier la différence entre les pertes de poids des souris, la virémie par RT-qPCR des souris immunisées après l'épreuve infectieuse et le taux de réponse des anticorps en ELISA contre les différentes cibles antigéniques. Lorsqu'une différence significative était observée avec l'ANOVA à mesures répétées, un test Post-Hoc LSD de Fisher était réalisé pour observer plus en détail où se situait la différence significative parmi les différentes modalités. En ANOVA à mesures répétées, la condition d'application du test est la sphéricité des données et si celle-ci n'est pas respectée une correction de Greenhouse-Geisser est appliquée.

3. Résultats

a. Détermination de la dose de ZIKV utilisée pour l'épreuve infectieuse des souris immunisées

Afin de déterminer la dose de ZIKV H/PF/2013 utilisée pour l'infection des souris des différents groupes d'immunisation, les doses 1 ou 10 PFU par souris ont été testées chez 3 souris par groupe. Les souris infectées avec 1 PFU ont commencé à perdre du poids aux alentours de 14 jours après infection et celles infectées avec 10 PFU aux alentours de 4 à 5 jours (Figure 2A). L'évolution de la survie des souris est statistiquement différente selon la dose reçue ($F(1, 8) = 22,43$, $P\text{-value} = 0,0015$). Les souris infectées avec 1 PFU ont une survie significativement plus longue qu'avec 10 PFU (Log-rank test, $P\text{-value} = 0,0295$) (Figure 2B). La dose de 10 PFU par souris a été retenue pour l'épreuve infectieuse des souris immunisées.

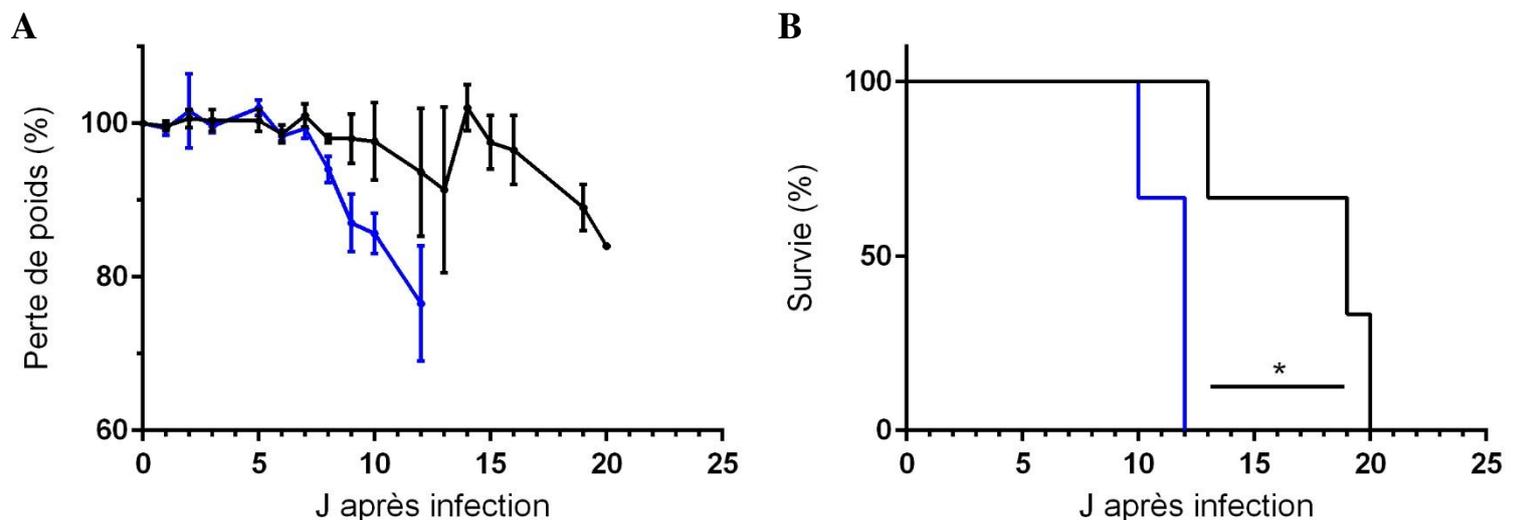


Figure 2. Perte de poids (A) et survie (B) des souris AG129 infectées avec différentes doses de ZIKV H/PF/2013. En noir, souris infectées avec 1 PFU de ZIKV et en bleu, avec 10 PFU. Sont représentés sur la courbe de perte de poids les moyennes des pourcentages de perte de poids et l'écart-type à la moyenne (Standard Deviation of Mean, SEM). * Log-rank test, $P\text{-value} < 0,05$.

b. Protection conférée par l'immunisation face à une épreuve infectieuse létale

Afin d'évaluer la protection induite par ce schéma d'immunisation, les souris ont été infectées avec 10 PFU de ZIKV H/PF/2013 4 semaines après la dernière immunisation. La perte de poids a débuté aux alentours de 4 jours après infection (Figure 3A). Les souris des

groupes contrôles, PBS et PLA, ont été sacrifiées 10 et 11 jours après infection comme les souris du groupe test PLA-ZEDIII (Figure 3B). La survie des souris du groupe contrôle ZEDIII a été légèrement plus longue avec un sacrifice des 2 dernières souris 14 jours après infection. Une différence significative de perte de poids est observée entre les différents groupes ($F(3, 18) = 5,18$, $P\text{-value} = 0,0093$) et plus précisément entre les groupes PLA-ZEDIII et ZEDIII ou PLA, entre ZEDIII et PBS, et PLA et PBS (Test Post-Hoc LSD de Fisher, $P\text{-value} < 0,05$) mais aucune différence significative de survie (Log-rank test, $P\text{-value} = 0,1255$) n'est observée entre les groupes contrôles, PBS, PLA et ZEDIII, et le groupe test, PLA-ZEDIII.

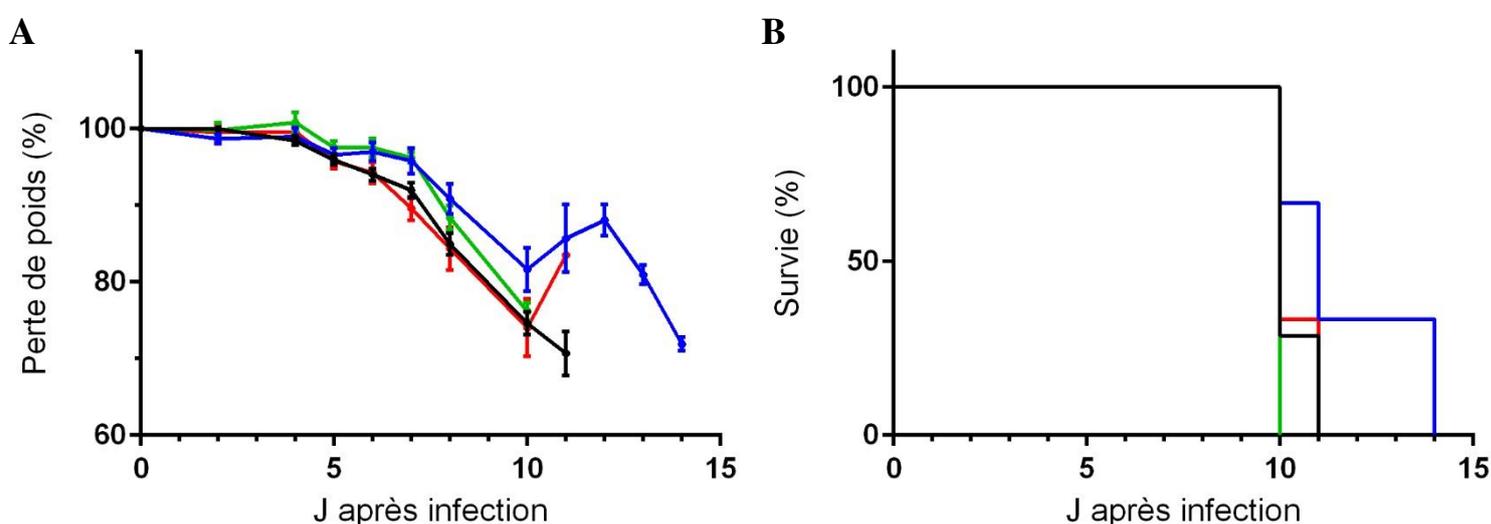


Figure 3. Perte de poids (A) et survie (B) des souris AG129 immunisées après une épreuve infectieuse ZIKV H/PF/2013. En noir, souris immunisées avec la formulation PLA-ZEDIII, en bleu, avec le ZEDIII, en vert, avec les PLA, en rouge, avec le PBS. Sont représentés sur la courbe de perte de poids les moyennes des pourcentages de perte de poids et l'écart-type à la moyenne (Standard Deviation of Mean, SEM).

La virémie des souris après infection a été suivie par RT-qPCR et est présentée dans la Figure 4. La virémie a débuté 1 à 2 jours après l'infection. Elle a augmenté de manière exponentielle jusqu'à atteindre un pic aux alentours de 5 à 6 jours avec une moyenne entre $1,2 \cdot 10^4$ et $9,0 \cdot 10^4$ copies d'ARN/ml. Aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes ($F(1,324, 7,943) = 0,4718$, $P\text{-value} = 0,5644$). L'immunisation ne confère aucune protection.

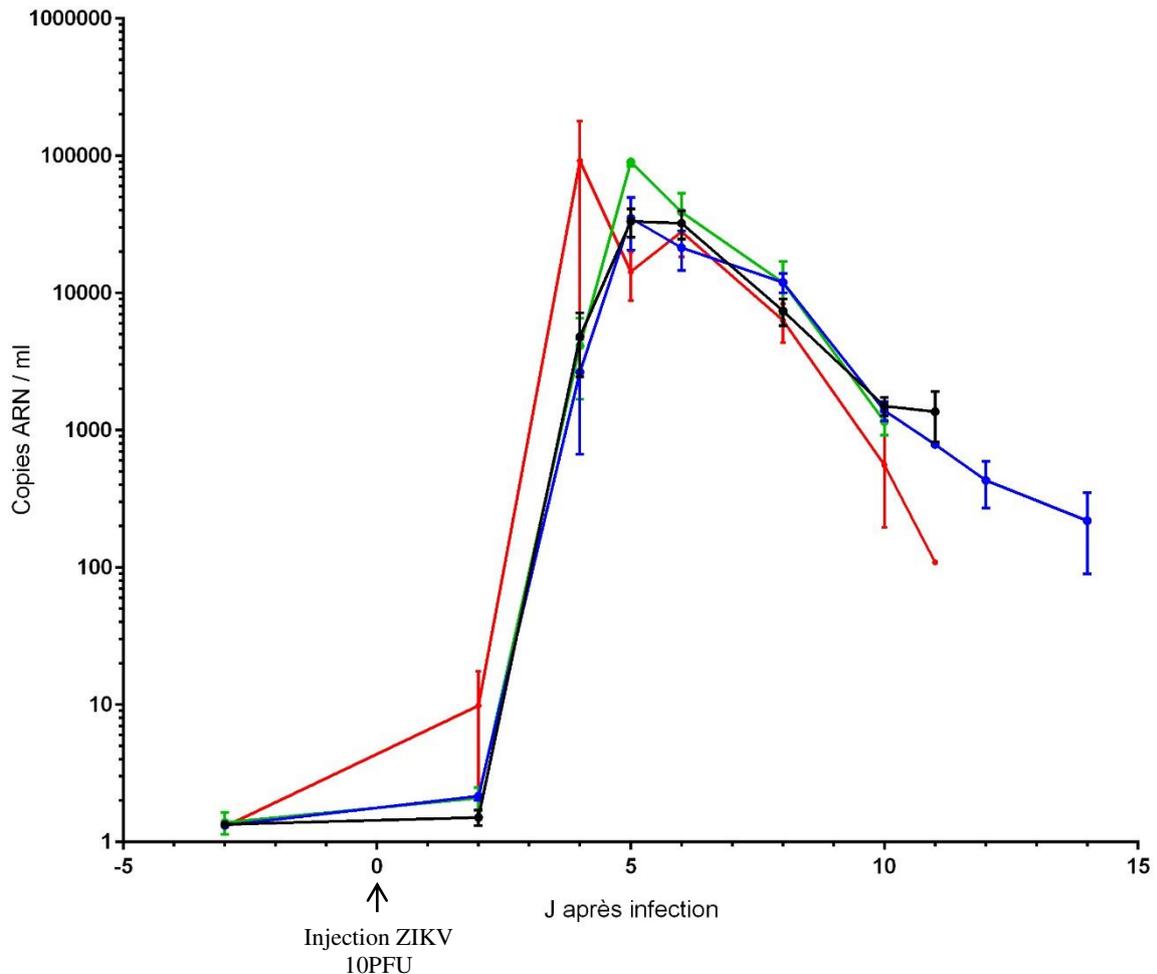


Figure 4. Cinétique de la virémie chez les souris. En noir, souris immunisées avec la formulation PLA-ZEDIII, en bleu, avec le ZEDIII, en vert, avec les PLA, en rouge, avec le PBS. Sont représentés les moyennes du nombre de copie d'ARN/ml et l'écart-type à la moyenne (Standard Deviation of Mean, SEM).

c. Reconnaissance des protéines recombinantes ou des virus par les IgG induites par immunisation avec le ZEDIII

Nous avons voulu analyser la reconnaissance par la méthode ELISA des EDIII recombinant ou de ZIKV par les anticorps induits lors de l'immunisation au cours du temps. Les limites de positivité ont été calculées pour chacune des cibles sur les échantillons prélevés avant la première immunisation. Elles sont de 1,23 (moyenne (m) = 1,00 et écart-type (σ) = 0,076), 1,15 (m = 0,97 et σ = 0,061) et 2,04 (m = 1,10 et σ = 0,314) de rDO pour ZEDIII, D4EDIII et ZIKV respectivement. Le taux de réponse au ZEDIII en ELISA des anticorps induits par immunisation avec la formulation PLA-ZEDIII est plus élevé que dans le groupe immunisé avec le ZEDIII sans adjuvant, les PLA ou le PBS (Figure 5A). Dès le premier

prélèvement, vingt jours après la première immunisation, 87,5% (n = 7/8) des souris du groupe PLA-ZEDIII et 62,5% (n = 5/8) des souris dans le groupe ZEDIII induisent des IgG dirigés contre le ZEDIII. Toutes les souris présentent un signal positif en ELISA contre le ZEDIII après le premier rappel, à J41, pour le groupe PLA-ZEDIII et après le second rappel à J56 pour le groupe ZEDIII. Le plus fort taux de réponse en ELISA a lieu 63 jours après la première immunisation et présente une moyenne de rDO \pm écart-type (Standard Deviation, SD) de $38,20 \pm 12,82$ pour le groupe PLA-ZEDIII et de $4,58 \pm 3,22$ pour le groupe ZEDIII. Une diminution de la réponse des anticorps est observée en ELISA au jour 68, 4 jours avant l'épreuve infectieuse. Selon le groupe de souris immunisées, l'évolution du taux de réponse des anticorps dirigés contre le ZEDIII en fonction du temps est différente (F (18, 120) = 13,72, P-value < 0,0001). On observe une différence significative entre les groupes PLA-ZEDIII et ZEDIII, PLA ou PBS, à partir de 41 jours après la première immunisation (Test Post-Hoc LSD de Fisher, P-value < 0,0001). Dans le groupe PLA-ZEDIII, le taux de réponse en ELISA contre ZIKV est plus faible que celui obtenu contre le ZEDIII mais le schéma de réponse observé est le même (Figure 5B). Un signal est observé en ELISA contre ZIKV à partir de J41 chez 50% des souris (n = 4/8) et à J56, on observe un signal chez 87,5 % des souris (n = 7/8) qui restent toujours positive en ELISA contre ZIKV à J68. Le plus fort taux de réponse en ELISA a lieu 63 jours après la première immunisation et présente une moyenne de rDO $5,58 \pm 2,63$ pour le groupe PLA-ZEDIII. Une seule souris du groupe ZEDIII présente un signal contre ZIKV en ELISA à partir de J56. Le signal est plus faible que celui du groupe PLA-ZEDIII (rDO moyen à J63 $1,63 \pm 0,42$) et présente un pic à J68 (rDO moyen $1,80 \pm 0,63$). Selon le groupe d'immunisation, l'évolution du taux de réponse des anticorps contre le ZIKV en fonction du temps est différente (F (18, 90) = 5,17, P-value < 0,0001). On observe une différence significative entre les groupes PLA-ZEDIII et ZEDIII ou PLA à partir de 41 jours après la première immunisation et à partir de 49 jours pour le groupe PBS (Test Post-Hoc LSD de Fisher, P-value < 0,05). Le signal observé contre D4EDIII 63 jours après immunisation n'est pas significatif (F (18, 120) = 0,512, P-value = 0,9482) (Figure 5C).

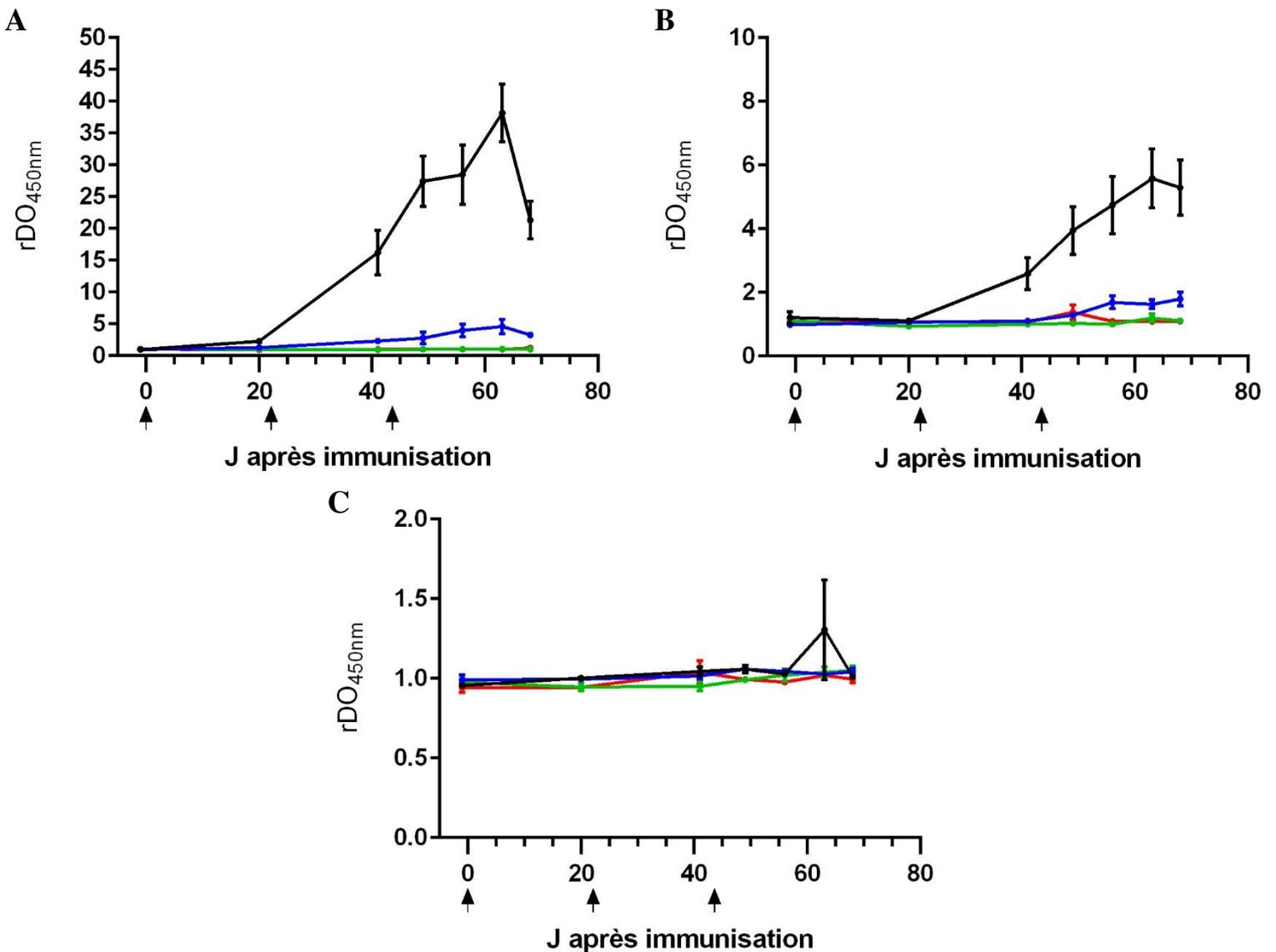


Figure 5. Cinétique de reconnaissance du ZEDIII (A), ZIKV (B) et D4EDIII (C) par les anticorps induits lors de l'immunisation. ELISA réalisé avec les plasmas des souris immunisées avec la formulation PLA-ZEDIII (noir), avec le ZEDIII (bleu), avec les PLA (vert) ou avec le PBS (rouge). Les flèches noires indiquent les jours d'immunisation. Sont représentées les moyennes des rapports de Densité Optique (rDO) et l'écart-type à la moyenne (Standard Deviation of Mean, SEM).

d. Capacité de séroneutralisation virale *in vitro* par les anticorps induits lors de l'immunisation avec le ZEDIII

La capacité séroneutralisante des plasmas de souris, 49, 56, 63 et 68 jours après la première immunisation, a été testée *in vitro* sur ZIKV et DENV4. Les résultats sont présentés

dans la Table 1. Les plasmas prélevés 49, 56 et 63 jours après immunisation présentaient une cytotoxicité rendant ininterprétable les résultats. Les plasmas prélevés 68 jours après immunisation ne présentent pas de cytotoxicité, le titre d'anticorps séroneutralisant est inférieur à $1/8^{\text{ème}}$ contre ZIKV ou DENV4, titre qui correspond à la plus faible dilution de plasma testé.

Table 1. Résultats de séroneutralisation de ZIKV et DENV4 *in vitro* par les sérums de souris immunisées.

		Cytotoxicité	Titre de séroneutralisation	
			ZIKV	DENV4
PLA-ZEDIII	J49	+	Inint.	Inint.
	J56	+	Inint.	Inint.
	J63	+	Inint.	Inint.
	J68	-	< 1/8	< 1/8
ZEDIII	J49	+	Inint.	Inint.
	J56	+	Inint.	Inint.
	J63	+	Inint.	Inint.
	J68	-	< 1/8	< 1/8
PLA	J49	+	Inint.	Inint.
	J56	+	Inint.	Inint.
	J63	+	Inint.	Inint.
	J68	-	< 1/8	< 1/8
PBS	J49	+	Inint.	Inint.
	J56	+	Inint.	Inint.
	J63	+	Inint.	Inint.
	J68	-	< 1/8	< 1/8

Abréviations : ZIKV, virus Zika ; DENV4, sérotype 4 du virus de la dengue ; Inint., résultat ininterprétable. Le (+) et le (-) représentent respectivement une cytotoxicité ou une absence de cytotoxicité du sérum.

4. Discussion et conclusion

La dernière épidémie de ZIKV de 2016 sur les continents américains a montré l'importance du développement de contre-mesures médicales face à un virus capable de transmission par de multiples voies, vectorielle ou interhumaine, et de sévères complications neurologiques chez l'adulte, les enfants, les nourrissons et les fœtus. De plus, dans un contexte de co-endémie, une séroprévalence flavivirale fréquente augmente potentiellement le risque d'ADE.

De nombreux vaccins sont en phases d'études plus ou moins avancées. Ils ont comme base vaccinale le virus inactivé (Modjarrad *et al.* 2018), des virus recombinants (Abbink *et al.* 2016 ; Abbink *et al.* 2017), des Virus-Like Particles (VLP) (Boigard *et al.* 2017 ; Garg *et al.* 2017 ; Salvo *et al.* 2018), de l'ADN (Abbink *et al.* 2017 ; Gaudinski *et al.* 2018; Larocca *et al.* 2016 ; Tebas *et al.* 2017) ou de l'ARNm (Pardi *et al.* 2017 ; Richner *et al.* 2017a ; Richner *et al.* 2017b) permettant l'expression de la protéine d'enveloppe, de pré-membrane ou de la capsid mais aucun d'entre eux n'est, pour le moment, autorisé chez l'homme. De nombreux épitopes présents dans la protéine E et la prM des *Flavivirus* sont les cibles des anticorps présentant une réactivité croisée pouvant conduire à de l'ADE (Barba-Spaeth *et al.* 2016 ; Dejnirattisai *et al.* 2016; Dejnirattisai *et al.* 2015). C'est pourquoi des efforts sont encore à mener afin d'identifier et d'améliorer de potentielles cibles vaccinales présentant des risques moins élevés.

Le ZEDIII a été identifié comme étant une cible spécifique des anticorps neutralisant du virus (Sapparapu *et al.* 2016 ; Stettler *et al.* 2016) qui protègent les souris face à une épreuve infectieuse létale de ZIKV sans provoquer d'ADE sur la DENV (Cabral-Miranda *et al.* 2019; Stettler *et al.* 2016 ; Zhao *et al.* 2016). A ce titre, un vaccin basé sur la protéine recombinante ZEDIII couplé à l'alun, a été développé et induit une réponse des anticorps spécifiques et neutralisants à un taux supérieur à la limite conférant une protection immunitaire face à une infection ZIKV avec un profil de réponse immunitaire cellulaire de type Th2. Cependant une protection face à une épreuve infectieuse létale n'a pas été montrée (Yang *et al.* 2017). Les adjuvants standards, comme l'alun, présentent un profil de réponse immunitaire cellulaire de type Th2 qui activent entre autres les lymphocytes B et ainsi la production d'anticorps (Brewer 2006 ; Del Giudice *et al.* 2018; Pavot *et al.* 2014). Cependant, lors d'infections de pathogènes intracellulaires ou de vaccination, une réponse immunitaire cellulaire de type Th1, capable d'activer entre autres les lymphocytes T CD8+, est fortement impliquée dans la

destruction des cellules infectées (Pardy *et al.* 2019). Les nanoparticules PLA, en plus de présenter de nombreux autres avantages, sont capables d'induire une forte réponse immunitaire humorale fonctionnelle mais également de stimuler la réponse immunitaire cellulaire (Danhier *et al.* 2012 ; Pavot *et al.* 2014).

Dans cette étude nous avons voulu évaluer le pouvoir protecteur des anticorps et de la réponse immunitaire cellulaire induite par une immunisation avec le ZEDIII en association ou non au PLA. Pour cela nous avons dans un premier temps déterminé la dose de ZIKV à injecter pour induire une pathologie liée à l'infection. Nous avons testé les doses de 1 et 10 PFU par souris et avons retenus 10 PFU car la survenue des symptômes était plus rapide qu'avec 1 PFU ceci permettant de diminuer le temps du protocole pour les souris tout en leur permettant un délai de réactivation des cellules mémoires issues de l'immunisation. Dans un second temps nous avons soumis les souris immunisées à une épreuve infectieuse. Nous n'observons aucune protection, aucune différence d'évolution de la virémie entre les différents groupes, et les expériences de séroneutralisation montrent que le titre d'anticorps séroneutralisant est inférieur à $1/8^{\text{ème}}$ ne permettant pas une séroneutralisation efficace. Cependant nous observons une forte induction de la réponse immunitaire humorale et un fort pouvoir adjuvant des nanoparticules PLA. Le taux d'IgG reconnaissant le ZEDIII du groupe de souris immunisé avec la formulation PLA-ZEDIII (rDO moyen de $38,20 \pm 12,82$) est 8 fois supérieur à celui du groupe immunisé avec le ZEDIII (rDO moyen de $4,58 \pm 3,22$). Le taux d'IgG des souris immunisées avec le PLA-ZEDIII dirigés contre ZIKV (rDO moyen de $5,58 \pm 2,63$) est environ 6 fois plus faible que celui observé contre le ZEDIII. Le taux d'IgG des souris du groupe vacciné avec le ZEDIII est plus faible et n'est observable que chez une seule souris (rDO moyen à J63 $1,63 \pm 0,4$). Ces résultats indiquent que les anticorps induits par l'immunisation ne sont pas capables de protéger les souris face à une épreuve infectieuse létale de ZIKV et semblent indiquer qu'une majorité des épitopes reconnus par les anticorps induits n'est pas accessible à la surface du virion, dans la conformation naturelle de la protéine E et ne peuvent donc pas neutraliser. Cette hypothèse a été récemment confirmée dans une étude montrant qu'un épitope immunodominant et non-neutralisant est présent dans le ZEDIII et masqué dans la protéine d'enveloppe totale à la surface du virion (Tai *et al.* 2019). En masquant cet épitope dans la protéine recombinante par introduction d'une N-Glycosylation au résidu d'acide aminé 375, le système immunitaire réoriente sa réponse vers les épitopes neutralisants initialement non-immunodominants et accessibles à la surface du virion (Figure 6A). Une immunisation avec le ZEDIII muté permet ainsi une protection des

souris face à une épreuve infectieuse létale de ZIKV (Tai *et al.* 2019). Les différences de taux d'IgG observées en ELISA contre le ZEDIII et ZIKV peuvent être en partie dues à la différence de quantité de domaine III présent soit dans les ELISA utilisant le ZEDIII soit le virus total inactivé. De plus, au vu des cinétiques de suivi des IgG en ELISA, l'épreuve infectieuse n'a pas été réalisée au pic de réponse immunitaire humorale mais dans une phase de déclin. On observe une diminution du taux d'anticorps contre le ZEDIII et ZIKV à J68, 4 semaines après la dernière immunisation dans les groupes PLA-ZEDIII 4 jours avant l'épreuve infectieuse. La même observation est faite dans le groupe immunisé avec le ZEDIII contre le ZEDIII. Un titre de séroneutralisation à J63 aurait pu être observé et l'évolution de l'infection chez les souris aurait pu potentiellement être différente mais à cause de la cytotoxicité des échantillons, les expériences de séroneutralisation ne nous permettent pas de répondre à cette hypothèse.

Plusieurs épitopes T ont été trouvés par bio-informatique dans le ZEDIII, ils sont représentés dans la figure 6B. Pour compléter cette étude nous souhaitons étudier le profil de réponse immunitaire cellulaire activé par ce genre d'immunisation. Nous souhaitons doser par une technique immunologique de multiplexage des cytokines (TNF-alpha, IFN-alpha, IFN-gamma, IL-1-alpha, IL-1-bêta, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p70 et IL-17A) dans le plasma à J68 et J75 après immunisation, soit 4 jours avant et 4 jours après l'épreuve infectieuse.

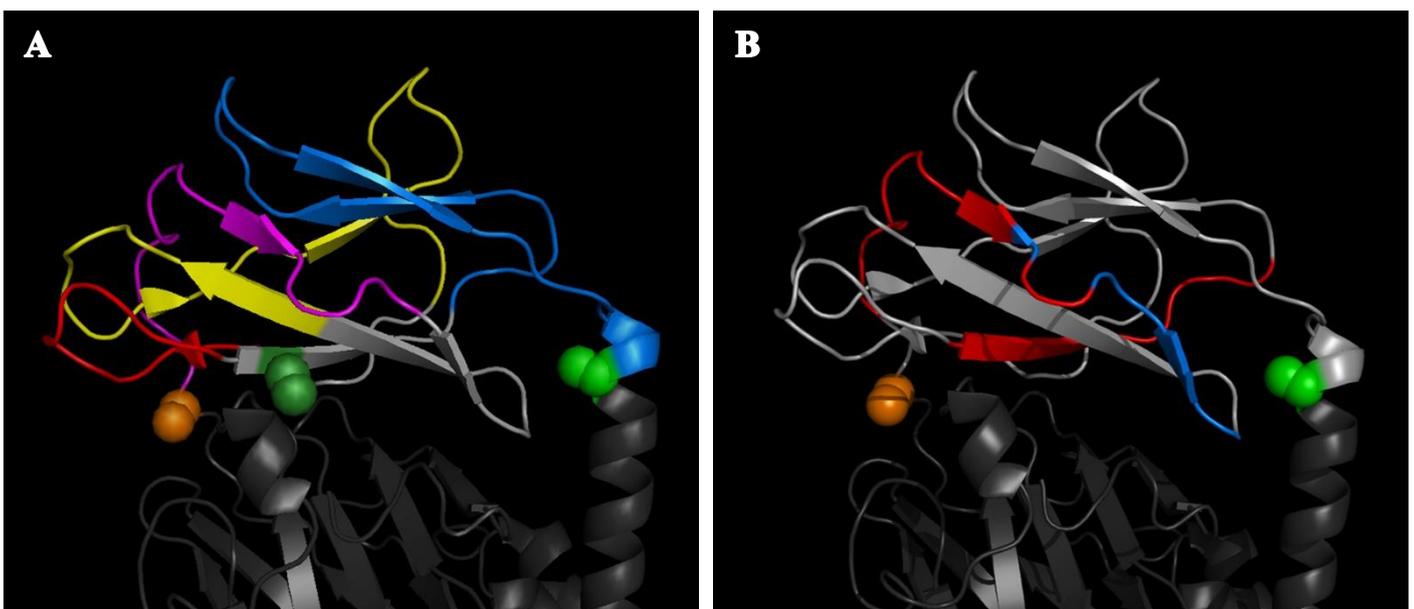


Figure 6. Structure tridimensionnelle du domaine III de la protéine d'enveloppe et ses épitopes B (A) ou épitopes T (B). Les figures ont été réalisées à partir de la structure

cristallisée de la protéine d'enveloppe de ZIKV (numéro d'accèsion PDB : 5IRE). Le ZEDIII est représenté en gris clair, les autres domaines de la protéine d'enveloppe en gris foncé. Les sphères orange et vert clair représentent respectivement le N-ter et le C-ter du ZEDIII sur la protéine d'enveloppe. **(A)** Les différents épitopes B ont été prédit à l'aide du logiciel en ligne ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) de l'Immune Epitope Database and Analysis Resource. Ils sont représentés en rouge, jaune, rose et bleu. La sphère vert foncé représente la méthionine 375 (M375) présente dans l'épitope immunodominant non neutralisant du ZEDIII, mutée par Tai *et al.* (Tai *et al.* 2019). **(B)** Les épitopes T CD8+ (n = 3) et T CD4+ (n = 1) sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Deux épitopes T CD8+ se chevauchent et l'épitopes T CD4+ chevauche un de ces deux épitopes T CD8+. Nous avons représenté, au niveau de ce chevauchement, les bornes (en rouge et en bleu) des épitopes correspondants (Alam *et al.* 2016).

Des anticorps monoclonaux (mAb) de souris induits contre le ZEDIII, développés au Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic dirigé par Laurent Bellanger du CEA de Marcoule, vont être utilisés pour effectuer des analyses immunohistologiques sur les différents organes prélevés chez les souris à J75, 4 jours après l'épreuve infectieuse. Ces analyses nous permettront d'étudier la différence de lésions et d'infiltration des tissus par ZIKV selon les différents groupes d'immunisation. La reconnaissance de ZIKV, DENV2, WNV et YFV ainsi que des EDIII de ZIKV, DENV2, DENV4 en ELISA par ces mAb a été étudiée. Deux d'entre eux ont été retenus. Le premier, ZDE3S (IgG1), reconnaît spécifiquement le ZEDIII et ZIKV tandis que le second, ZDE8S (IgG2A), présente une reconnaissance croisée des EDIII ainsi que ZIKV, DENV2 et WNV. Leurs profils de réponse sur les EDIII et les virus testés sont présentés dans la figure 7.

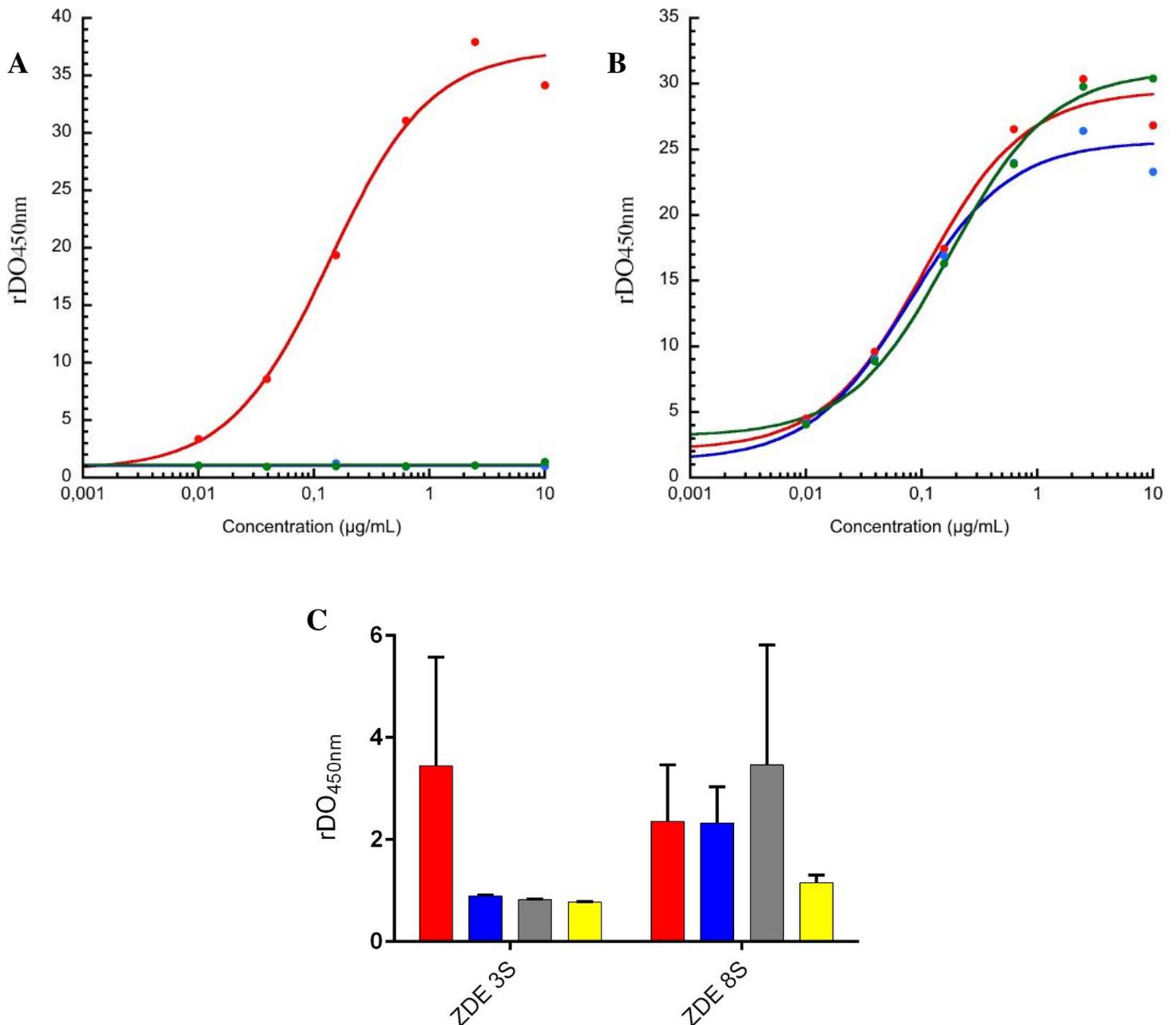


Figure 7. Caractérisation de la reconnaissance des anticorps monoclonaux ZDE 3S et ZDE 8S. **(A)** Reconnaissance en ELISA de ZEDIII (rouge ; K_d apparent = 0,14 $\mu\text{g/mL}$), D2EDIII (bleu) et D4EDIII (vert) par ZDE 3S. Equation de la courbe d'ajustement : $y = (\text{max} - \text{min}) \times \left(\frac{\text{Conc}}{K_{dapp} + \text{Conc}} \right) + \text{min}$. **(B)** Reconnaissance en ELISA de ZEDIII (rouge ; K_d apparent = 0,11 $\mu\text{g/mL}$), D2EDIII (bleu; K_d apparent = 0,08 $\mu\text{g/mL}$) et D4EDIII (vert; K_d apparent = 0,18 $\mu\text{g/mL}$) par ZDE 8S. L'équation de la courbe d'ajustement est la même que pour ZDE 3S. **(C)** Reconnaissance en ELISA de ZIKV (rouge), DENV2 (bleu), WNV (gris) et YFV (jaune) inactivés par ZDE 3S et ZDE 8S. Concentration d'anticorps utilisée : 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Sont représentés la moyenne des rapports de Densité Optique (rDO) et l'écart-type à

la moyenne (Standard Deviation of Mean, SEM).

Une des limites de notre étude repose sur la formulation PLA-ZEDIII qui n'était pas stable plus de 48 heures. Les formulations étaient donc réalisées 48 heures avant chaque immunisation au Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'ingénierie Thérapeutique (LBTI) à Lyon puis envoyées à l'Institut Pasteur de Paris. Une agrégation des nanoparticules, liée à la concentration du complexe PLA-ZEDIII, était observée les rendant ainsi insolubles. La quantité de ZEDIII injectée lors des immunisations était donc limitée et plus faible que dans d'autres études (Cabral-Miranda *et al.* 2019; Yang *et al.* 2017). Bien que ce paramètre ne semble pas être critique pour l'immunogénicité de la protéine et l'induction d'une réponse immunitaire humorale, le titre en anticorps neutralisants y est sensible (Tai *et al.* 2019). De plus, le faible nombre d'animaux des groupes contrôles diminue la puissance de notre étude. Enfin, et afin de pouvoir comparer notre formulation PLA-ZEDIII à d'autres études, un groupe contrôle standard employant l'alun comme adjuvant manque à notre étude.

Le modèle animal utilisé dans notre étude a déjà été utilisé dans plusieurs études. Il est présenté comme un modèle pertinent pour étudier les infections ZIKV (Aliota *et al.* 2016 ; Richner *et al.* 2017a ; Rossi *et al.* 2016 ; Salvo *et al.* 2018), cependant il reste très sensible au virus et nous avons observé 100% de mortalité chez les souris infectées avec 1 PFU. Une étude montre que la DL₅₀ de ZIKV H/PF/2013 chez les souris AG129 est de 0,19 PFU par souris (Salvo *et al.* 2018). Les interférons de types I jouent un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T et sont particulièrement important pour la mise en place de la réponse immunitaire des lymphocytes T cytotoxiques (CD8) (Pardy *et al.* 2019). Le modèle murin utilisé étant déficient en récepteurs aux interférons de type I et II, et bien que d'autres voies d'activation des lymphocytes T existent, l'activation de la réponse immunitaire cellulaire peut ne refléter qu'une réalité partielle de la réponse immunitaire face à une infection. Les cellules dendritiques étant les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces pour activer les populations de lymphocytes T lors de réponses immunitaire (Brewer 2006), il est envisageable de coupler des PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) aux PLA afin de potentialiser leur effet adjuvant en activant les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Le mannane ou le mannose seraient par exemple de bonnes molécules de stimulation car ils sont reconnus par différents récepteurs aux lectines de type C des cellules dendritiques (Danhier *et al.* 2012), l'acide polyuridylique (polyU) est un analogue synthétique de l'ARN simple brin, agoniste des TLR7, permettant la stimulation de la présentation croisée des antigènes chez les CPA ou encore les oligonucléotides CpG qui sont des analogues

synthétique de l'ADN double brin, agoniste des TLR9, permettant d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire de type T CD8+ (Bergmann-Leitner *et al.* 2014).

Pour conclure sur ces résultats, bien que nous observions un fort pouvoir adjuvant des nanoparticules PLA permettant une forte induction de la réponse immunitaire humorale contre le ZEDIII, la reconnaissance du virus en ELISA est faible et aucune protection *in vivo* et *in vitro* face au virus n'est observée. Ce résultat peut être expliqué par la présence d'un épitope majeur non-neutralisant dans le ZEDIII (Tai *et al.* 2019). La sûreté, la stabilité et l'immunogénicité étant les piliers d'un bon vaccin et bien que ceux basés sur les protéines recombinantes sont moins immunogènes et efficaces que les vaccins basés sur des virus inactivés ou vivant atténués, ils restent plus sûrs et capables d'induire une immunité protectrice (Cabral-Miranda *et al.* 2019 ; Demento *et al.* 2010 ; Du *et al.* 2017 ; Tai *et al.* 2019 ; Wang *et al.* 2019; Yang *et al.* 2017).

DISCUSSION

Les infections aux *Flavivirus* présentant un tableau clinique commun, la co-circulation de ces virus et la réactivité croisée des anticorps ne facilitent pas la pose d'un sérodiagnostic fiable. Cependant, aux vues des sévères complications que ces infections peuvent induire, le diagnostic rapide et fiable est primordial. Le critère le plus pertinent d'un bon diagnostic d'infections aux *Flavivirus* est sa spécificité. Au cours des travaux présentés dans ce manuscrit nous nous sommes intéressés au virus Zika (ZIKV) et avons développé un outil de sérodiagnostic basé sur la reconnaissance du domaine III de la protéine d'enveloppe de ZIKV. Cet ELISA détecte les IgG, induites lors d'une infection ZIKV, dans les sérums ou les plasmas humains avec une sensibilité de 92,0 % et une spécificité de 89,9%. Ces tests de validation ont été réalisés avec le lignage asiatique de ZIKV et des échantillons de patients infectés par une souche très homologue à ce lignage, isolée en Polynésie française en 2013. Cependant, et bien qu'il y ait une forte homologie de séquence (> 98,0%) au sein des ZEDIII entre le lignage asiatique et africain, nous ne pouvons prévoir avec certitude les performances de détection des IgG dirigées contre le lignage africain avec ce test. Bien que la souche infectante ne puisse pas être identifiée, plusieurs essais seraient à mener pour déterminer la capacité de reconnaissance (i) du ZEDIII du lignage africain ou (ii) du ZEDIII du lignage asiatique par les IgG induites par le lignage africain de ZIKV et (iii) du ZEDIII du lignage africain par les IgG induites par le lignage asiatique de ZIKV. Croiser les résultats de ces expériences nous permettrait d'avoir un meilleur recul sur l'employabilité de cet outil de diagnostic en routine et dans le cas d'épidémie. Le diagnostic du premier cas ZIKV autochtone dans le sud de la France (Durand *et al.* 2020), infecté par une souche non prédéterminée par un essai contrôlé et bien que cette souche soit proche de la souche asiatique, confirme la capacité de détection d'une infection par cet ELISA, et renforce sa fiabilité.

Afin d'émettre un résultat de diagnostic le plus fiable possible, il est nécessaire de connaître les limites temporelles d'employabilité de cet outil. La sensibilité, la spécificité, la reproductibilité et l'aspect semi-quantitatif de notre ELISA d'une part, et une cohorte dont le suivi clinique et immunitaire est bien caractérisé d'autre part, nous ont permis d'estimer une fenêtre d'utilisation de cet outil de diagnostic. Ainsi, cet ELISA détecte les IgG anti-ZEDIII à partir de 7 jours et jusqu'à un peu plus d'un an et demi après le début des symptômes. Les mêmes travaux ont été réalisés sur les IgM anti-ZIKV détectés par l'ELISA au CNR des

arbovirus. Grâce à l'étude des cinétiques des réponses anticorps, nous avons pu mettre en évidence l'existence de deux groupes sur la base des jours de négativation des IgM. L'un d'eux présente un profil de réponse immunitaire primaire caractérisé par une intensité de réponse IgM plus forte, négativant tardivement, environ 2 mois après le début des symptômes et une réponse immunitaire des IgG tardive, moins intense et se négativant environ un an et demi après le début des symptômes. L'autre profil présente une réponse immunitaire apparente à un profil de réponse immunitaire face à une infection secondaire. Il est caractérisé par une intensité de réponse IgM plus faible devenant indétectable environ 30 jours après le début des symptômes et une intensité de réponse IgG plus forte, apparaissant rapidement et négativant tardivement, environ un an et dix mois après le début des symptômes. Ces différents profils ont déjà été observés en zones de co-endémie où, lors d'une infection ZIKV chez un patient ayant une cicatrice immunologique flavivirale, la réponse immunitaire induite a le profil d'une réponse immunitaire secondaire (Barzon *et al.* 2018 ; Ohst *et al.* 2018; Steinhagen *et al.* 2016). Le profil de réponse immunitaire, semblable à une réponse immunitaire secondaire, est préférentiellement associé à une forte virémie. Les réactions croisées des anticorps dirigées contre les *Flavivirus*, induits lors d'une infection primaire, pouvant faciliter les infections secondaires (Rogers *et al.* 2017), la forte virémie observée pourrait être causée par celles-ci. Etudier les cinétiques d'apparition et de disparition de ces anticorps induisant une facilitation d'infection ou une neutralisation (Robbiani *et al.* 2017) croisée de différents *Flavivirus* et les comparer entre les différents groupes mis en évidence dans nos travaux nous permettraient de fournir des informations intéressantes pour la prise en charge des patients et pour une étude plus physiologique de ces mécanismes dans des études fondamentales.

Nous avons également réalisé une séparation des patients selon le statut immunitaire flaviviral pré-existant d'une part, ou le score clinique, d'autre part. Tous deux font ressortir des tendances de corrélation avec ces profils de réponse immunitaire. Que l'on sépare selon les jours de négativation des IgM anti-ZIKV, selon la cicatrice sérologique flavivirale ou selon le score clinique, les profils que l'on observe s'apparentent tous à ces deux profils de réponse immunitaire précédemment décrits. Cependant, nous n'avons pas encore réussi à établir une corrélation statistiquement significative. Une mauvaise classification de la cicatrice immunologique et des scores cliniques de quelques patients pourraient en être l'origine. Les données épidémiologiques et de la cicatrice immunologique pourraient être

consolidées et plus pertinentes notamment en réalisant des tests de séroneutralisation de plusieurs *Flavivirus* avec les premiers prélèvements des patients.

Au-delà du simple outil de diagnostic, du fait de la capacité de détection d'une cicatrice sérologique ZIKV plus d'un an et demi après le début des symptômes, notre outil pourrait s'inscrire dans des études de dépistage plus vastes. Le seuil de l'immunité collective, limitant la propagation des infections ZIKV dans une population, a été estimé à 56,5% (Massad *et al.* 2019). Dans certains pays ayant déjà vécu une épidémie à ZIKV, la séoprévalence de la population se situe en dessous de ce seuil, ce qui n'est pas suffisant pour empêcher une nouvelle circulation de ZIKV sur ces territoires. Les études de séoprévalence sont donc nécessaires puisqu'elles offrent une visibilité sur la couverture immunitaire face aux maladies infectieuses permettant ainsi d'évaluer le risque épidémique. Les forces militaires françaises sont déployées dans de nombreux pays où co-circulent plusieurs *Flavivirus*. En connaissant leur statut immunitaire face à ces virus, avant leurs déploiements, nous pourrions prévoir l'impact d'un foyer épidémique émergent. Cependant par manque de test de référence spécifique et rapide il reste difficile de mesurer cette séoprévalence (Fritzell *et al.* 2018). La rapidité de mise en œuvre, les performances et la grande fenêtre de détection de l'outil de diagnostic basé sur la protéine recombinante du ZEDIII en font un bon outil directement applicable au diagnostic de routine au CNR des arbovirus (Durand *et al.* 2020), aux études de séoprévalence et plus particulièrement pour déterminer le statut sérologique ZIKV des femmes enceintes ou prévoyant une grossesse. En effet, face aux sévères complications congénitales observées lors d'une infection ZIKV il est important de pouvoir orienter et de prévoir le suivi médical de ces femmes et des fœtus.

Comme nous venons d'en discuter, le diagnostic tardif grâce aux IgG présente plusieurs avantages. Cependant, le diagnostic précoce apporte lui aussi des informations importantes, notamment pour estimer si l'infection est récente. Bien que la détection des IgM dans le diagnostic des infections ZIKV soit assez spécifique, il semble difficile de mettre en œuvre deux ELISA différents pour la détection des IgM et IgG avec deux cibles. De plus le MAC-ELISA mis en œuvre pour détecter les IgM sur ZIKV total inactivé au CNR des arbovirus utilise des virus entiers inactivés nécessitant des laboratoires confinés pour leur production et des anticorps polyclonaux pouvant apporter des problèmes de réactions aspécifiques. Le développement de l'ELISA pour la détection des IgM avec le ZEDIII sera nécessaire et avantageux. Dans ce principe de diagnostic à grande échelle, nous souhaitons également développer des plaques ELISA présensibilisées avec les protéines ZEDIII. Cependant, comme

nous l'avons montré dans notre article, la sensibilité et la spécificité de l'ELISA basé sur le ZEDIII est sensible à la dénaturation du ZEDIII par la perte d'épitopes conformationnels et l'apparition de nouveaux épitopes, linéaires ou conformationnels initialement masqués, aspécifique. Une lyophilisation cryogénique du ZEDIII pourrait peut-être préserver la protéine dans sa conformation native et ainsi les performances de l'outil de diagnostic (Liu *et al.* 2015). De précédents travaux issus d'une collaboration entre le CNR des arbovirus et bioMérieux ont également permis le développement de tests de diagnostic rapide sur papier des virus de la dengue et du chikungunya. Il est donc envisageable d'adapter cette technologie au diagnostic de ZIKV (Theillet *et al.* 2019; Theillet *et al.* 2018).

Nous avons été amenés à caractériser plusieurs anticorps monoclonaux de souris développés par le laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic dirigé par Laurent Bellanger au CEA de Marcoule. La caractérisation de leur reconnaissance en ELISA de ZIKV, DENV2, WNV et YFV a été réalisée par le CNR des arbovirus. Nous avons également caractérisé leur affinité apparente, et leur reconnaissance en ELISA des EDIII de ZIKV, DENV2, DENV4. Deux d'entre eux présentent un profil de reconnaissance intéressant et complémentaire, nous avons donc fait réaliser leur séquençage et isotypage en vue d'une expression en système bactérien et d'une future résolution de leur structure cristallographique. L'anticorps ZDE 3S (IgG1), reconnaît spécifiquement le ZEDIII et ZIKV. Le second, ZDE 8S (IgG2A), présente un profil plutôt pan-*Flavivirus* et reconnaît ZIKV, DENV2 et WNV ainsi que leur EDIII. L'étude de leur statut neutralisant et facilitant les infections ainsi que la résolution de leur structure cristallographique en interaction avec leurs cibles antigénique nous permettrait d'étudier d'une manière plus mécanistique leur interaction et les épitopes spécifiques (ZDE3S) et communs (ZDE8S) aux différents *Flavivirus* mis en jeu dans la reconnaissance. En effet les anticorps non spécifiques sont décrits pour favoriser l'ADE. Des études avec le Biacore seraient à mettre en place afin d'approfondir nos connaissances sur l'interaction de ces anticorps avec les différentes protéines EDIII, s'en suivrait alors une optimisation de la séquence de l'EDIII mis en œuvre dans les ELISA de diagnostic pour améliorer les performances du test mais aussi pour optimiser la réponse immunitaire induite contre cette protéine lors d'immunisation. Ces anticorps offrent également de nombreuses opportunités. Tout d'abord ils présentent un intérêt pour le développement du diagnostic et notamment pour la détection des IgM induites lors d'infection ZIKV en MAC-ELISA. Ils pourraient ainsi remplacer les ascites dans ces essais. Ceci présenterait un double avantage en diminuant (i) d'une part le temps d'expérimentation et (ii)

d'autre part les potentielles réactions croisées que l'on peut observer en multipliant le nombre d'anticorps employés dans les ELISA. De plus, nous souhaitons les utiliser pour les analyses immunohistologiques, après les avoir couplés à la HRP, afin d'étudier les lésions et l'infiltration des tissus par ZIKV dans notre étude d'immunisation de souris avec le ZEDIII. Enfin, ces anticorps couplés à un fluorochrome permettraient d'étudier les mécanismes d'action intervenant dans la facilitation des infections par les anticorps en étudiant par exemple la prise en charge et le trafic du virus en interaction avec son anticorps dans les cellules. Pour finir, ces anticorps, s'ils se révèlent neutralisants, pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le cadre d'infection ZIKV.

Les capacités de l'outil de diagnostic, basé sur la reconnaissance de la protéine recombinante d'EDIII, que nous avons développé sont prometteuses pour une future adaptation aux autres *Flavivirus* tel que DENV, WNV ou YFV. Ceci, toujours dans ce principe de diagnostic rapide, minimiserait la dangerosité et optimiserait la fiabilité et le temps utilisé pour le diagnostic de routine au CNR des arbovirus. Il serait d'autant plus intéressant pour le diagnostic de DENV. En effet, l'ADE est particulièrement décrite pour ce *Flavivirus* qui, lors d'une infection secondaire avec un second sérotype, induit des fièvres hémorragiques sévères. Cette pathologie est également observée lorsque les patients naïfs DENV, vaccinés avec le vaccin tétravalent Dengvaxia, rencontrent un premier sérotype de DENV. Face à cette problématique, il est nécessaire de diagnostiquer au préalable les patients afin d'inoculer le vaccin aux personnes ayant déjà une cicatrice immunitaire DENV (Aguiar *et al.* 2018; Aguiar *et al.* 2016a ; Aguiar *et al.* 2016b). Dans ce sens, le développement d'outils de diagnostic spécifiques des infections flavivirales est donc nécessaire et les performances de l'ELISA, basé sur la reconnaissance de l'EDIII, le présente comme un outil de choix. C'est désormais un nouveau projet du laboratoire, avec un étudiant de master travaillant sur cette problématique et qui poursuivrait ces travaux en thèse.

Les études que nous avons menées afin d'étudier la sensibilité de notre test face aux anticorps impliqués dans la réactivité croisée nous ont permis de valider la grande spécificité de notre ELISA. Ces expérimentations nous ont également permis de mettre en évidence la potentielle présence, dans les sérums humains, d'anticorps induits contre la DENV reconnaissant également ZIKV. En effet, comme il a déjà été décrit (Bhaumik *et al.* 2018; Rogers *et al.* 2017), certains lymphocytes B mémoires d'anciennes infections flavivirales peuvent être réactivés par une nouvelle infection à un autre *Flavivirus* dont le paratope est suffisamment affin pour ces nouveaux épitopes. Ces lymphocytes B réactivés subiraient, au

cours de leur nouvelle expansion clonale, des hypermutations somatiques dans les gènes codants pour le paratope qui pourraient augmenter son affinité pour les épitopes encore jamais détectés. Les anticorps seraient capables de reconnaître à la fois ces deux virus. Ces anticorps polyclonaux purifiés sur le ZEDIII seraient de nouveaux outils pour étudier le pouvoir de neutralisation croisée et facilitateur d'infection (i) des anticorps anti-ZEDIII mais également, après l'épuisement de ces derniers dans les sérums, (ii) des anticorps dirigés contre les autres cibles que le ZEDIII. Ces résultats seraient obtenus dans des conditions plus proches de la physiologie, bien que perfectibles, que ce qui est réalisé avec des anticorps monoclonaux. De plus, induire des mutations dans les EDIII nous offrirait la possibilité d'identifier et d'étudier les épitopes potentiellement impliqués dans ces processus. Etudier ces réactions croisées avec des EDIII d'autres *Flavivirus* tel que WNV ou YFV permettrait également d'approfondir les connaissances sur les limites d'homologie et d'identité de séquence impliquées dans ces réactivités. Toutefois, les capacités de neutralisation croisée et de facilitation sont dépendantes de la concentration en anticorps. Il est donc difficile de classer les anticorps de manière certaine. Ainsi, un anticorps neutralisant présent à une concentration inférieure à son affinité est capable d'induire de l'ADE alors que présent en concentration suffisante il est neutralisant (Bardina *et al.* 2017 ; Kawiecki *et al.* 2016 ; Wang *et al.* 2017) en opsonisant l'antigène.

Bien que le ZEDIII soit décrit comme une cible des anticorps neutralisants (Sapparapu *et al.* 2016 ; Stettler *et al.* 2016), lors des essais d'immunisation d'un modèle murin, que nous avons effectués avec un complexe ZEDIII-nanoparticules, nous n'avons observé aucune protection *in vivo* et *in vitro* face au virus. Récemment, une étude a montré la présence d'un épitope immunodominant dans le ZEDIII, lorsqu'il est sous forme de protéine recombinante, mais non accessible à la surface du virion et donc non neutralisant. L'insertion d'une mutation dans cet épitope réoriente la réponse immunitaire vers les épitopes neutralisants et accessible à la surface du virion. Cette protéine protège alors les souris face à une épreuve infectieuse (Tai *et al.* 2019). Néanmoins, nous avons pu observer un fort pouvoir adjuvant des nanoparticules PLA malgré une instabilité de la formulation ZEDIII-PLA à plus de 48 heures. Cette stabilité pouvant également affecter la qualité de la réponse immunitaire (Niikura *et al.* 2013) des études complémentaires seraient à mener pour l'optimiser. Différents éléments peuvent affecter leur stabilité notamment les caractéristiques physicochimiques du tampon (pH, salinité, ...), la taille des nanoparticules ou encore la concentration en ZEDIII. L'adsorption du ZEDIII à la surface des nanoparticules se fait par des liaisons électrostatiques impliquant ainsi une répartition et une orientation du ZEDIII à la surface des nanoparticules

hétérogène de ce fait, une présentation d'épitopes au système immunitaire hétérogène. La non-dangereuse, la stabilité et l'immunogénicité étant les piliers d'un bon vaccin et bien que ceux basés sur les protéines recombinantes soient moins immunogènes et efficaces que les vaccins basés sur des virus inactivés ou vivants atténués, ils restent plus sûrs et capables d'induire une immunité protectrice (Cabral-Miranda *et al.* 2019 ; Demento *et al.* 2010 ; Du *et al.* 2017 ; Tai *et al.* 2019 ; Wang *et al.* 2019; Yang *et al.* 2017).

Les nanoparticules utilisées dans cette étude comme adjuvants sont connues pour leur effet stimulant de la réponse immunitaire humorale et cellulaire dans le cadre d'immunisations (Danhier *et al.* 2012 ; Pavot *et al.* 2014). Une analyse du profil d'expression des cytokines nous permettra d'étudier le profil de la réponse immunitaire cellulaire induite lors d'immunisation avec le ZEDIII. Nous avons pour cela choisi un panel de cytokines large en essayant de représenter les différentes populations immunitaires cellulaires et également le profil de réponse antivirale associé. Afin d'optimiser la stimulation de la réponse immunitaire cellulaire, il est possible de coupler les nanoparticules avec des PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) afin de potentialiser leur effet adjuvant. Les cellules dendritiques étant les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces pour activer les populations de lymphocytes T lors de réponses immunitaires (Brewer 2006), les N-Glycanes comme le mannane ou le mannose seraient par exemple de bonnes molécules de stimulation car ils sont reconnus par différents récepteurs aux lectines de type C présents chez les cellules dendritiques et les macrophages (Agregli *et al.* 2019; Danhier *et al.* 2012), l'acide polyuridylique (polyU), un analogue synthétique de l'ARN simple brin, agoniste des TLR7, stimule la présentation croisée des antigènes chez les cellules présentatrices d'antigènes ou encore les oligonucléotides CpG, analogues synthétiques de l'ADN double brin, agoniste des TLR9, induisant une réponse immunitaire humorale et cellulaire de type T CD8+ (Bergmann-Leitner *et al.* 2014).

L'outil de diagnostic de ZIKV, basé sur la reconnaissance du ZEDIII, développé au cours de ces travaux offre, au-delà du diagnostic, de nombreuses applications en recherche fondamentale. Il se présente comme un outil de détection des anticorps spécifiques de ZIKV sensible, spécifique et semi-quantitatif dont la fenêtre d'emploi temporelle est caractérisée. L'employabilité pour la détection des différents lignages reste à confirmer mais le pourcentage d'homologie de séquence entre le lignage asiatique et africain est plutôt encourageant. Cette preuve de concept ouvre sur de belles promesses pour le développement d'outil de sérodiagnostic flaviviral. La protéine recombinante ZEDIII, bien que possédant un

épitope immunodominant non neutralisant (Tai *et al.* 2019), est une cible des anticorps spécifique de ZIKV et des anticorps neutralisants (Robbiani *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2010). Elle pourrait être, après mutation de cet épitope, une base vaccinale sûre et immunogène.

REFERENCES

A

- Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, Arya RP, Seferovic MD, Vogt MB, . . . Rico-Hesse R (2017) Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Scientific reports* 7:41389 doi:10.1038/srep41389
- Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, . . . Barouch DH (2016) Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 353(6304):1129-32 doi:10.1126/science.aah6157
- Abbink P, Larocca RA, Visitsunthorn K, Boyd M, De La Barrera RA, Gromowski GD, . . . Barouch DH (2017) Durability and correlates of vaccine protection against Zika virus in rhesus monkeys. *Science translational medicine* 9(420) doi:10.1126/scitranslmed.aao4163
- Adcock RS, Chu YK, Golden JE, Chung DH (2017) Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. *Antiviral research* 138:47-56 doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.018
- Agrelli A, de Moura RR, Crovella S, Brandao LAC (2019) ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 69:22-29 doi:10.1016/j.meegid.2019.01.018
- Aguiar M, Stollenwerk N (2018) Dengvaxia Efficacy Dependency on Serostatus: A Closer Look at More Recent Data. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 66(4):641-642 doi:10.1093/cid/cix882
- Aguiar M, Stollenwerk N, Halstead SB (2016a) The Impact of the Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLoS neglected tropical diseases* 10(12):e0005179 doi:10.1371/journal.pntd.0005179
- Aguiar M, Stollenwerk N, Halstead SB (2016b) The risks behind Dengvaxia recommendation. *The Lancet Infectious diseases* 16(8):882-3 doi:10.1016/S1473-3099(16)30168-2
- Alam A, Ali S, Ahamad S, Malik MZ, Ishrat R (2016) From ZikV genome to vaccine: in silico approach for the epitope-based peptide vaccine against Zika virus envelope glycoprotein. *Immunology* 149(4):386-399 doi:10.1111/imm.12656
- Alcendor DJ (2017) Zika Virus Infection of the Human Glomerular Cells: Implications for Viral Reservoirs and Renal Pathogenesis. *The Journal of infectious diseases* 216(2):162-171 doi:10.1093/infdis/jix171
- Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE (2016) Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS neglected tropical diseases* 10(4):e0004682 doi:10.1371/journal.pntd.0004682
- Amaro F, Sanchez-Seco MP, Vazquez A, Alves MJ, Ze-Ze L, Luz MT, . . . De Ory F (2019) The Application and Interpretation of IgG Avidity and IgA ELISA Tests to Characterize Zika Virus Infections. *Viruses* 11(2) doi:10.3390/v11020179
- Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rua A, Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB (2016) Culex mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(35) doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.35.30333
- Andraud M, Fablet C, Renson P, Eono F, Mahe S, Bourry O, Rose N (2018) Estimating

- Parameters Related to the Lifespan of Passively Transferred and Vaccine-Induced Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Type I Antibodies by Modeling Field Data. *Frontiers in veterinary science* 5:9 doi:10.3389/fvets.2018.00009
- Annamalai AS, Pattnaik A, Sahoo BR, Muthukrishnan E, Natarajan SK, Steffen D, . . . Pattnaik AK (2017) Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *Journal of virology* 91(23) doi:10.1128/JVI.01348-17
- ANSM (2016) Rapport annuel 2016. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). https://www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/8c5a443c987ce404048ed5af9d1b73cc.pdf Accessed 29/11/2019
- Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Broult J, Paulous S, . . . Musso D (2015) Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011-2013. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 41:11-2 doi:10.1016/j.ijid.2015.10.005
- Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, . . . Cao-Lormeau VM (2017) Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging infectious diseases* 23(4):669-672 doi:10.3201/eid2304.161549
- Ayllon T, Campos RM, Brasil P, Morone FC, Camara DCP, Meira GLS, . . . Honorio NA (2017) Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging infectious diseases* 23(8):1411-1412 doi:10.3201/eid2308.162007
- Aymeric J.-L., Lefranc G. (2009) *Immunologie humaine*. de boeck, Bruxelles
- Azeredo EL, Dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Correa J, Sanchez-Arcila JC, . . . Venancio da Cunha R (2018) Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS currents* 10 doi:10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5

B

- Balasubramanian A, Teramoto T, Kulkarni AA, Bhattacharjee AK, Padmanabhan R (2017) Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. *Antiviral research* 137:141-150 doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.015
- Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, . . . Corti D (2017) Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(31):8384-8389 doi:10.1073/pnas.1704984114
- Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, Garcia N, Saborio S, Elizondo D, . . . Harris E (2018) Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. *Journal of clinical microbiology* 56(3) doi:10.1128/JCM.01785-17
- Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, . . . Rey FA (2016) Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* 536(7614):48-53 doi:10.1038/nature18938
- Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, . . . Lim JK (2017) Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science* 356(6334):175-180 doi:10.1126/science.aal4365
- Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, . . . Addas-Carvalho M (2016) Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*

- 56(7):1684-8 doi:10.1111/trf.13681
- Barrows NJ, Campos RK, Powell ST, Prasanth KR, Schott-Lerner G, Soto-Acosta R, . . . Garcia-Blanco MA (2016) A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell host & microbe* 20(2):259-70 doi:10.1016/j.chom.2016.07.004
- Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, . . . Palu G (2016) Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(10):30159 doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159
- Barzon L, Percivalle E, Pacenti M, Rovida F, Zavattoni M, Del Bravo P, . . . Baldanti F (2018) Virus and Antibody Dynamics in Travelers With Acute Zika Virus Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 66(8):1173-1180 doi:10.1093/cid/cix967
- Bearcroft WG (1956) Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 50(5):442-8
- Beasley DW, Holbrook MR, Travassos Da Rosa AP, Coffey L, Carrara AS, Phillippi-Falkenstein K, . . . Barrett AD (2004) Use of a recombinant envelope protein subunit antigen for specific serological diagnosis of West Nile virus infection. *Journal of clinical microbiology* 42(6):2759-65 doi:10.1128/JCM.42.6.2759-2765.2004
- Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, . . . Barrett AD (2005) Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology* 79(13):8339-47 doi:10.1128/JVI.79.13.8339-8347.2005
- Beck C, Despres P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, . . . Lecollinet S (2015) A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *BioMed research international* 2015:678084 doi:10.1155/2015/678084
- Beck C, Leparc-Goffart I, Desoutter D, Deberge E, Bichet H, Lowenski S, . . . Lecollinet S (2019) Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS neglected tropical diseases* 13(2):e0007162 doi:10.1371/journal.pntd.0007162
- Bergmann-Leitner ES, Leitner WW (2014) Adjuvants in the Driver's Seat: How Magnitude, Type, Fine Specificity and Longevity of Immune Responses Are Driven by Distinct Classes of Immune Potentiators. *Vaccines* 2(2):252-96 doi:10.3390/vaccines2020252
- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D (2014) Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 19(13)
- Bhaumik SK, Priyamvada L, Kauffman RC, Lai L, Natrajan MS, Cho A, . . . Wrammert J (2018) Pre-Existing Dengue Immunity Drives a DENV-Biased Plasmablast Response in ZIKV-Infected Patient. *Viruses* 11(1) doi:10.3390/v11010019
- Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, Likos A (2016) Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 65(18):475-8 doi:10.15585/mmwr.mm6518e2
- Blohm GM, Lednicky JA, Marquez M, White SK, Loeb JC, Pacheco CA, . . . Paniz-Mondolfi AE (2017) Complete Genome Sequences of Identical Zika virus Isolates in a Nursing Mother and Her Infant. *Genome announcements* 5(17) doi:10.1128/genomeA.00231-

- Boigard H, Alimova A, Martin GR, Katz A, Gottlieb P, Galarza JM (2017) Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS neglected tropical diseases* 11(5):e0005608 doi:10.1371/journal.pntd.0005608
- Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, . . . Brasil P (2016) Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 10(6):e0004816 doi:10.1371/journal.pntd.0004816
- Boorman JP, Porterfield JS (1956) A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 50(3):238-42 doi:10.1016/0035-9203(56)90029-3
- Bosch I, de Puig H, Hiley M, Carre-Camps M, Perdomo-Celis F, Narvaez CF, . . . Gehrke L (2017) Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Science translational medicine* 9(409) doi:10.1126/scitranslmed.aan1589
- Bradley MP, Nagamine CM (2017) Animal Models of Zika Virus. *Comparative medicine* 67(3):242-252
- Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, . . . Nielsen-Saines K (2016) Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine* 375(24):2321-2334 doi:10.1056/NEJMoa1602412
- Brewer JM (2006) (How) do aluminium adjuvants work? *Immunology letters* 102(1):10-5 doi:10.1016/j.imlet.2005.08.002
- Bueno MG, Martinez N, Abdalla L, Duarte Dos Santos CN, Chame M (2016) Animals in the Zika Virus Life Cycle: What to Expect from Megadiverse Latin American Countries. *PLoS neglected tropical diseases* 10(12):e0005073 doi:10.1371/journal.pntd.0005073
- Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, Salazar V, Veselinovic M, Diamond MS, Geiss BJ (2017) The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral research* 137:134-140 doi:10.1016/j.antiviral.2016.11.023
- Bulletin dengue PF 24/01/14 (2014) Surveillance de la dengue et du Zika en Polynésie française - 24 Janvier 2014. Direction de la santé, Centre d'Hygiène et de Salubrité Publique de Polynésie française. http://www.hygiene-publique.gov.pf/IMG/pdf/bulletin_dengue_24-01-14.pdf Accessed 07/01/2019
- Bulletin dengue PF 28/02/14 (2014) Surveillance de la dengue et du Zika en Polynésie française - 28 février 2014. Direction de la santé, Centre d'Hygiène et de Salubrité Publique de Polynésie française. http://www.hygiene-publique.gov.pf/IMG/pdf/bulletin_zika-dengue_.pdf Accessed 07/01/2019
- Bulletin dengue PF 28/03/14 (2014) Surveillance de la dengue et du Zika en Polynésie française - 28 mars 2014. Direction de la santé, Centre d'Hygiène et de Salubrité Publique de Polynésie française. http://www.hygiene-publique.gov.pf/IMG/pdf/bulletin_dengue_28-03-14.pdf Accessed 07/01/2019

C

- Cabral-Miranda G, Lim SM, Mohsen MO, Pobelov IV, Roesti ES, Heath MD, . . . Bachmann MF (2019) Zika Virus-Derived E-DIII Protein Displayed on Immunologically Optimized VLPs Induces Neutralizing Antibodies without Causing Enhancement of Dengue Virus Infection. *Vaccines* 7(3) doi:10.3390/vaccines7030072
- Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, . . . de Filippis AMB (2016) Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious diseases* 16(6):653-660 doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5

- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, . . . Ghawche F (2016) Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 387(10027):1531-1539 doi:10.1016/S0140-6736(16)00562-6
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, . . . Musso D (2014) Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases* 20(6):1085-6 doi:10.3201/eid2006.140138
- Carbaugh DL, Baric RS, Lazear HM (2019) Envelope Protein Glycosylation Mediates Zika Virus Pathogenesis. *Journal of virology* 93(12) doi:10.1128/JVI.00113-19
- Carrillo-Hernandez MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gomez-Rangel SY, Martinez-Gutierrez M (2018) Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC infectious diseases* 18(1):61 doi:10.1186/s12879-018-2976-1
- Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugieres P, Fourati S, . . . Mekontso Dessap A (2016) Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *The New England journal of medicine* 374(16):1595-6 doi:10.1056/NEJMc1602964
- Castanha PMS, Erdos G, Watkins SC, Falo LD, Jr., Marques ETA, Barratt-Boyes SM (2020) Reciprocal immune enhancement of dengue and Zika virus infection in human skin. *JCI insight* 5(3) doi:10.1172/jci.insight.133653
- Cauchemez S, Besnard M, Bompard P, Dub T, Guillemette-Artur P, Eyrolle-Guignot D, . . . Mallet HP (2016) Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet* 387(10033):2125-2132 doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6
- CDC Zika virus symptoms. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html> Accessed 17/09/2019
- Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP, Chik KK, . . . Yuen KY (2016) Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging microbes & infections* 5:e93 doi:10.1038/emi.2016.99
- Chouin-Carneiro T, Vega-Rua A, Vazeille M, Yebakima A, Girod R, Goindin D, . . . Failloux AB (2016) Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS neglected tropical diseases* 10(3):e0004543 doi:10.1371/journal.pntd.0004543
- Chu JH, Rajamanonmani R, Li J, Bhuvanankantham R, Lescar J, Ng ML (2005) Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain III from the envelope glycoprotein. *The Journal of general virology* 86(Pt 2):405-412 doi:10.1099/vir.0.80411-0
- Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, . . . Diamond MS (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(50):19111-6 doi:10.1073/pnas.0605668103
- Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, Kramer LD (2017) Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerging infectious diseases* 23(7):1110-1117 doi:10.3201/eid2307.161633
- CIRE (2015) Bilan des épidémies de dengue aux Antilles-Guyane de 2012 à 2014. Bulletin de veille sanitaire n° 2 - 3. Cellule interrégionale d'épidémiologie (CIRE) Antilles-Guyane. <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/guyane/documents/bulletin-regional/2015/bulletin-de-veille-sanitaire-antilles-guyane.-n-2-3-mars-2015> Accessed

16/03/2020

- Cole JB, Null DJ, Vanraden PM (2009) Best prediction of yields for long lactations. *J Dairy Sci* 92(4):1796-810 doi:10.3168/jds.2007-0976
- Collins MH, Tu HA, Gimblet-Ochieng C, Liou GA, Jadi RS, Metz SW, . . . de Silva AM (2019) Human antibody response to Zika targets type-specific quaternary structure epitopes. *JCI insight* 4(8) doi:10.1172/jci.insight.124588
- Colombo TE, Estofolete CF, Reis AFN, da Silva NS, Aguiar ML, Cabrera EMS, . . . Nogueira ML (2017) Clinical, laboratory and virological data from suspected ZIKV patients in an endemic arbovirus area. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 96:20-25 doi:10.1016/j.jcv.2017.09.002
- Conde JN, da Silva EM, Allonso D, Coelho DR, Andrade IDS, de Medeiros LN, . . . Mohana-Borges R (2016) Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of virology* 90(21):9570-9581 doi:10.1128/JVI.00912-16

D

- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, . . . Leparac-Goffart I (2016) Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *The New England journal of medicine* 374(22):2195-8 doi:10.1056/NEJMc1604449
- Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, . . . Gao GF (2016) Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell host & microbe* 19(5):696-704 doi:10.1016/j.chom.2016.04.013
- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161(2):505-22 doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- Daudens-Vaysse E, Ledrans M, Gay N, Ardillon V, Cassadou S, Najjioullah F, . . . Zika Surveillance Working G (2016) Zika emergence in the French Territories of America and description of first confirmed cases of Zika virus infection on Martinique, November 2015 to February 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(28) doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.28.30285
- de Laval F, d'Aubigny H, Matheus S, Labrousse T, Ensargueix AL, Lorenzi EM, . . . Briolant S (2018) Evolution of symptoms and quality of life during Zika virus infection: A 1-year prospective cohort study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 109:57-62 doi:10.1016/j.jcv.2018.09.015
- de Oliveira WK, de Franca GVA, Carmo EH, Duncan BB, de Souza Kuchenbecker R, Schmidt MI (2017) Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *Lancet* 390(10097):861-870 doi:10.1016/S0140-6736(17)31368-5
- Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, . . . Screaton GR (2016) Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature immunology* 17(9):1102-8 doi:10.1038/ni.3515
- Dejnirattisai W, Wongwiwat W, Supasa S, Zhang X, Dai X, Rouvinski A, . . . Screaton GR (2015) A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature immunology* 16(2):170-177 doi:10.1038/ni.3058

- Del Giudice G, Rappuoli R, Didierlaurent AM (2018) Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in immunology* 39:14-21 doi:10.1016/j.smim.2018.05.001
- Demento SL, Bonafe N, Cui W, Kaech SM, Caplan MJ, Fikrig E, . . . Fahmy TM (2010) TLR9-targeted biodegradable nanoparticles as immunization vectors protect against West Nile encephalitis. *Journal of immunology* 185(5):2989-97 doi:10.4049/jimmunol.1000768
- Deng YQ, Dai JX, Ji GH, Jiang T, Wang HJ, Yang HO, . . . Qin CF (2011) A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. *PloS one* 6(1):e16059 doi:10.1371/journal.pone.0016059
- Denis J, Attoumani S, Gravier P, Tenebray B, Garnier A, Briolant S, . . . Badaut C (2019) High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. *PLoS neglected tropical diseases* 13(9):e0007747 doi:10.1371/journal.pntd.0007747
- Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, . . . Diallo M (2015) Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases* 15:492 doi:10.1186/s12879-015-1231-2
- Dick GW (1952) Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46(5):521-34 doi:10.1016/0035-9203(52)90043-6
- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46(5):509-20 doi:10.1016/0035-9203(52)90042-4
- Dodson BL, Rasgon JL (2017) Vector competence of *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. *PeerJ* 5:e3096 doi:10.7717/peerj.3096
- Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezelj VV, Clark JJ, Cordeiro MT, . . . Kohl A (2016) Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 10(10):e0005048 doi:10.1371/journal.pntd.0005048
- Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, . . . Espinal MA (2016) Zika Virus and the Guillain-Barre Syndrome - Case Series from Seven Countries. *The New England journal of medicine* 375(16):1598-1601 doi:10.1056/NEJMc1609015
- Du L, Zhou Y, Jiang S (2017) The latest advancements in Zika virus vaccine development. *Expert review of vaccines* 16(10):951-954 doi:10.1080/14760584.2017.1363648
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, . . . Hayes EB (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine* 360(24):2536-43 doi:10.1056/NEJMoa0805715
- Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E (2016) Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* 387(10023):1051 doi:10.1016/S0140-6736(16)00624-3
- Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, Gourinat AC (2015) Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerging infectious diseases* 21(2):381-2 doi:10.3201/eid2102.141553
- Durand GA, Piorkowski G, Thirion L, Ninove L, Giron S, Zandotti C, . . . de Lamballerie X (2020) Vector-Borne Transmission of the Zika Virus Asian Genotype in Europe. *Viruses* 12(3) doi:10.3390/v12030296
- Durand MA, Bel M, Ruwey I, Marfel M, Yug L, Ngaden V (2005) An outbreak of dengue fever in Yap State. *Pacific health dialog* 12(2):99-102

E

- ECDC (2019) Rapid risk assessment - Zika virus transmission worldwide. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/zika-risk-assessment-9-april-2019.pdf> Accessed 19/06/2019
- Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I (2017) Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLoS neglected tropical diseases* 11(11):e0005933 doi:10.1371/journal.pntd.0005933

F

- Faria NR, Azevedo R, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, . . . Vasconcelos PFC (2016) Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* 352(6283):345-349 doi:10.1126/science.aaf5036
- Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA (2013) Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology journal* 10:311 doi:10.1186/1743-422X-10-311
- Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, . . . Sall AA (2014) Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS neglected tropical diseases* 8(1):e2636 doi:10.1371/journal.pntd.0002636
- FDA Emergency Use Authorization. U. S. Food and Drug Administration (FDA).
<https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization> Accessed 27/11/2019
- Fernandes RS, Campos SS, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM, Barbosa da Silva KA, Castro MG, . . . Lourenco-de-Oliveira R (2016) *Culex quinquefasciatus* from Rio de Janeiro Is Not Competent to Transmit the Local Zika Virus. *PLoS neglected tropical diseases* 10(9):e0004993 doi:10.1371/journal.pntd.0004993
- Fernandez E, Dejnirattisai W, Cao B, Scheaffer SM, Supasa P, Wongwiwat W, . . . Diamond MS (2017) Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature immunology* 18(11):1261-1269 doi:10.1038/ni.3849
- Fernando S, Fernando T, Stefanik M, Eyer L, Ruzek D (2016) An Approach for Zika Virus Inhibition Using Homology Structure of the Envelope Protein. *Molecular biotechnology* 58(12):801-806 doi:10.1007/s12033-016-9979-1
- Filipe AR, Martins CM, Rocha H (1973) Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 43(4):315-9 doi:10.1007/bf01556147
- Flipse J, Wilschut J, Smit JM (2013) Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic* 14(1):25-35 doi:10.1111/tra.12012
- Fontes-Garfias CR, Shan C, Luo H, Muruato AE, Medeiros DBA, Mays E, . . . Shi PY (2017) Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell reports* 21(5):1180-1190 doi:10.1016/j.celrep.2017.10.016
- Fontes BM (2016) Zika virus-related hypertensive iridocyclitis. *Arquivos brasileiros de oftalmologia* 79(1):63 doi:10.5935/0004-2749.20160020
- Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, . . . Tesh RB (2011) Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging infectious diseases* 17(5):880-2 doi:10.3201/eid1705.101939

- Franca GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, . . . Victora CG (2016) Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 388(10047):891-7 doi:10.1016/S0140-6736(16)30902-3
- Fritzell C, Rousset D, Adde A, Kazanji M, Van Kerkhove MD, Flamand C (2018) Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS neglected tropical diseases* 12(7):e0006533 doi:10.1371/journal.pntd.0006533
- Frumence E, Roche M, Krejbich-Trotot P, El-Kalamouni C, Nativel B, Rondeau P, . . . Despres P (2016) The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN-beta production and apoptosis induction. *Virology* 493:217-26 doi:10.1016/j.virol.2016.03.006
- Fulton BO, Sachs D, Schwarz MC, Palese P, Evans MJ (2017) Transposon Mutagenesis of the Zika Virus Genome Highlights Regions Essential for RNA Replication and Restricted for Immune Evasion. *Journal of virology* 91(15) doi:10.1128/JVI.00698-17
- Furtado JM, Esposito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA (2016) Uveitis Associated with Zika Virus Infection. *The New England journal of medicine* 375(4):394-6 doi:10.1056/NEJMc1603618

G

- Gake B, Vernet MA, Leparç-Goffart I, Drexler JF, Gould EA, Gallian P, de Lamballerie X (2017) Low seroprevalence of Zika virus in Cameroonian blood donors. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* 21(4):481-483 doi:10.1016/j.bjid.2017.03.018
- Gallian P, Cabie A, Richard P, Patrel L, Charrel RN, Pastorino B, . . . de Lamballerie X (2017) Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood* 129(2):263-266 doi:10.1182/blood-2016-09-737981
- Garg H, Sedano M, Plata G, Punke EB, Joshi A (2017) Development of Virus-Like-Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus. *Journal of virology* 91(20) doi:10.1128/JVI.00834-17
- Gaudinski MR, Houser KV, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell RS, . . . teams VRCs (2018) Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet* 391(10120):552-562 doi:10.1016/S0140-6736(17)33105-7
- Gendernalik A, Weger-Lucarelli J, Garcia Luna SM, Fauver JR, Ruckert C, Murrieta RA, . . . Ebel GD (2017) American *Aedes vexans* Mosquitoes are Competent Vectors of Zika Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96(6):1338-1340 doi:10.4269/ajtmh.16-0963
- Giron S, Franke F, Decoppet A, Cadiou B, Travaglini T, Thirion L, . . . Leparç-Goffart I (2019) Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 24(45) doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655
- Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, . . . Theel ES (2017) Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *Journal of clinical microbiology* 55(7):2127-2136 doi:10.1128/JCM.00580-17
- Granger D, Theel ES (2019) Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Assay and Two

- Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of IgM-Class Antibodies to Zika Virus. *Journal of clinical microbiology* 57(3) doi:10.1128/JCM.01413-18
- Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, . . . Garcia-Sastre A (2016) Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell host & microbe* 19(6):882-90 doi:10.1016/j.chom.2016.05.009
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, . . . Leroy EM (2014) Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS neglected tropical diseases* 8(2):e2681 doi:10.1371/journal.pntd.0002681
- Greenberg JA, Lujan DA, DiMenna MA, Wearing HJ, Hofkin BV (2013) Identification of blood meal sources in *Aedes vexans* and *Culex quinquefasciatus* in Bernalillo County, New Mexico. *Journal of insect science* 13:75 doi:10.1673/031.013.7501
- Grifoni A, Pham J, Sidney J, O'Rourke PH, Paul S, Peters B, . . . Sette A (2017) Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. *Journal of virology* 91(24) doi:10.1128/JVI.01469-17

H

- Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, . . . Weaver SC (2012) Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases* 6(2):e1477 doi:10.1371/journal.pntd.0001477
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, . . . Misse D (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology* 89(17):8880-96 doi:10.1128/JVI.00354-15
- Hammon WM, Schrack WD, Jr., Sather GE (1958) Serological survey for a arthropod-borne virus infections in the Philippines. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 7(3):323-8 doi:10.4269/ajtmh.1958.7.323
- Hermanns K, Gohner C, Kopp A, Schmidt A, Merz WM, Markert UR, . . . Drosten C (2018) Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerging microbes & infections* 7(1):198 doi:10.1038/s41426-018-0199-6
- Hess AS, Islam Z, Hess MK, Rowland RR, Lunney JK, Doeschl-Wilson A, . . . Dekkers JC (2016) Comparison of host genetic factors influencing pig response to infection with two North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Genet Sel Evol* 48(1):43 doi:10.1186/s12711-016-0222-0
- Hill SC, Vasconcelos J, Neto Z, Jandondo D, Ze-Ze L, Aguiar RS, . . . Faria NR (2019) Emergence of the Asian lineage of Zika virus in Angola: an outbreak investigation. *The Lancet Infectious diseases* 19(10):1138-1147 doi:10.1016/S1473-3099(19)30293-2
- Hoen B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabie A, . . . Fontanet A (2018) Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *The New England journal of medicine* 378(11):985-994 doi:10.1056/NEJMoa1709481
- Holbrook MR, Shope RE, Barrett AD (2004) Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tick-borne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito-borne flaviviruses. *Journal of clinical microbiology* 42(9):4101-10 doi:10.1128/JCM.42.9.4101-4110.2004
- Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M (2016) High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European*

I

- Ikejezie J, Shapiro CN, Kim J, Chiu M, Almiron M, Ugarte C, . . . Aldighieri S (2017) Zika Virus Transmission - Region of the Americas, May 15, 2015-December 15, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 66(12):329-334 doi:10.15585/mmwr.mm6612a4
- Islam ZU, Bishop SC, Savill NJ, Rowland RR, Lunney JK, Tribble B, Doeschl-Wilson AB (2013) Quantitative analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viremia profiles from experimental infection: a statistical modelling approach. *PloS one* 8(12):e83567 doi:10.1371/journal.pone.0083567

J

- Janeway Charles A., Travers P., Walport M., Shlomchik Mark J. (2003) *Le système immunitaire fondamental et pathologique*. de boeck, Bruxelles
- Jawinski K, Hartmann M, Singh C, Kinnear E, Busse DC, Ciabattini A, . . . Tregoning JS (2019) Recombinant Haemagglutinin Derived From the Ciliated Protozoan *Tetrahymena thermophila* Is Protective Against Influenza Infection. *Frontiers in immunology* 10:2661 doi:10.3389/fimmu.2019.02661
- Jeong YE, Cha GW, Cho JE, Lee EJ, Jee Y, Lee WJ (2017) Viral and serological kinetics in Zika virus-infected patients in South Korea. *Virology journal* 14(1):70 doi:10.1186/s12985-017-0740-6

K

- Kadkhoda K, Gretchen A, Racano A (2017) Evaluation of a commercially available Zika virus IgM ELISA: specificity in focus. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 88(3):233-235 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.002
- Kawiecki AB, Christofferson RC (2016) Zika Virus-Induced Antibody Response Enhances Dengue Virus Serotype 2 Replication In Vitro. *The Journal of infectious diseases* 214(9):1357-1360 doi:10.1093/infdis/jiw377
- Kenney JL, Romo H, Duggal NK, Tzeng WP, Burkhalter KL, Brault AC, Savage HM (2017) Transmission Incompetence of *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens pipiens* from North America for Zika Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96(5):1235-1240 doi:10.4269/ajtmh.16-0865
- Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C (2016) Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization* 94(9):675-686C doi:10.2471/BLT.16.171082
- Klema VJ, Padmanabhan R, Choi KH (2015) Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* 7(8):4640-56 doi:10.3390/v7082837
- Knudsen NP, Olsen A, Buonsanti C, Follmann F, Zhang Y, Coler RN, . . . Agger EM (2016) Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Scientific reports* 6:19570 doi:10.1038/srep19570
- Kodati S, Palmore TN, Spellman FA, Cunningham D, Weistrop B, Sen HN (2017) Bilateral

- posterior uveitis associated with Zika virus infection. *Lancet* 389(10064):125-126 doi:10.1016/S0140-6736(16)32518-1
- Kostyuchenko VA, Lim EX, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JS, . . . Lok SM (2016) Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* 533(7603):425-8 doi:10.1038/nature17994
- Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V, Branton W, . . . Hobman TC (2016) Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO reports* 17(12):1766-1775 doi:10.15252/embr.201642627
- Kuno G, Chang GJ (2007) Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology* 152(4):687-96 doi:10.1007/s00705-006-0903-z
- Kurani S, Theel E, Greenberg-Worisek A (2018) Diagnostic Testing for Zika: Observing Rapid Translation During a Public Health Emergency. *Clinical and translational science* 11(2):103-105 doi:10.1111/cts.12529

L

- L'Azou M, Jean-Marie J, Bessaud M, Cabie A, Cesaire R, de Lamballerie X, . . . Richard P (2015) Dengue seroprevalence in the French West Indies: a prospective study in adult blood donors. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 92(6):1137-1140 doi:10.4269/ajtmh.14-0211
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, . . . Duffy MR (2008) Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases* 14(8):1232-9 doi:10.3201/eid1408.080287
- Larocca RA, Abbink P, Peron JP, Zanotto PM, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, . . . Barouch DH (2016) Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* 536(7617):474-8 doi:10.1038/nature18952
- Lazear HM, Diamond MS (2016) Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *Journal of virology* 90(10):4864-4875 doi:10.1128/JVI.00252-16
- Le Hingrat Q, Perrier M, Charpentier C, Jacquot A, Houhou-Fidouh N, Descamps D, Visseaux B (2019) Was Zika introduced to Brazil by participants at the 2013 Beach Soccer World Cup held in Tahiti: A phylogeographical analysis. *Travel medicine and infectious disease*:101512 doi:10.1016/j.tmaid.2019.101512
- Lednicky J, Beau De Rochars VM, El Badry M, Loeb J, Telisma T, Chavannes S, . . . Morris JG, Jr. (2016) Zika Virus Outbreak in Haiti in 2014: Molecular and Clinical Data. *PLoS neglected tropical diseases* 10(4):e0004687 doi:10.1371/journal.pntd.0004687
- Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N, Tang W, . . . Gleeson JG (2016) Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. *Cell stem cell* 19(5):593-598 doi:10.1016/j.stem.2016.08.005
- Li Z, Brecher M, Deng YQ, Zhang J, Sakamuru S, Liu B, . . . Li H (2017) Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell research* 27(8):1046-1064 doi:10.1038/cr.2017.88
- Liu B, Zhou X (2015) Freeze-drying of proteins. *Methods in molecular biology* 1257:459-76 doi:10.1007/978-1-4939-2193-5_23
- Liu J, Liu Y, Nie K, Du S, Qiu J, Pang X, . . . Cheng G (2016) Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature microbiology* 1(9):16087 doi:10.1038/nmicrobiol.2016.87
- Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, . . . Cheng G (2017a) Evolutionary enhancement

- of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* 545(7655):482-486
doi:10.1038/nature22365
- Liu Z, Zhou T, Lai Z, Zhang Z, Jia Z, Zhou G, . . . Chen XG (2017b) Competence of *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes as Zika Virus Vectors, China. *Emerging infectious diseases* 23(7):1085-1091
doi:10.3201/eid2307.161528
- Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E (2016) Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(26) doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30269

M

- Magnani DM, Rogers TF, Beutler N, Ricciardi MJ, Bailey VK, Gonzalez-Nieto L, . . . Watkins DI (2017) Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Science translational medicine* 9(410)
doi:10.1126/scitranslmed.aan8184
- Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, Izopet J (2017) Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens. *Emerging infectious diseases* 23(5):863-865 doi:10.3201/eid2305.161631
- Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A (1969) Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 18(3):411-5 doi:10.4269/ajtmh.1969.18.411
- Marques VM, Santos CS, Santiago IG, Marques SM, Nunes Brasil MDG, Lima TT, Costa PS (2019) Neurological Complications of Congenital Zika Virus Infection. *Pediatric neurology* 91:3-10 doi:10.1016/j.pediatrneurol.2018.11.003
- Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, . . . Zaki S (2016) Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 65(6):159-60
doi:10.15585/mmwr.mm6506e1
- Massad E, Coutinho FAB, Wilder-Smith A (2019) Modelling an optimum vaccination strategy against ZIKA virus for outbreak use. *Epidemiology and infection* 147:e196
doi:10.1017/S0950268819000712
- Matheus S, Talla C, Labeau B, de Laval F, Briolant S, Berthelot L, . . . Rousset D (2019) Performance of 2 Commercial Serologic Tests for Diagnosing Zika Virus Infection. *Emerging infectious diseases* 25(6):1153-1160 doi:10.3201/eid2506.180361
- May M, Relich RF (2016) A Comprehensive Systems Biology Approach to Studying Zika Virus. *PloS one* 11(9):e0161355 doi:10.1371/journal.pone.0161355
- McCarthy M (2016) Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *Bmj* 352:i720 doi:10.1136/bmj.i720
- Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, . . . Sabeti PC (2017) Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 546(7658):411-415
doi:10.1038/nature22402
- Michelson Y, Lustig Y, Avivi S, Schwartz E, Danielli A (2019) Highly Sensitive and Specific Zika Virus Serological Assays Using a Magnetic Modulation Biosensing System. *The Journal of infectious diseases* 219(7):1035-1043 doi:10.1093/infdis/jiy606
- Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E (2017) CD14(+)CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear

- cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature microbiology* 2(11):1462-1470
doi:10.1038/s41564-017-0035-0
- Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, . . . Apte RS (2016) Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell reports* 16(12):3208-3218 doi:10.1016/j.celrep.2016.08.079
- Ministère de la santé (I) (2019) Maladie à virus Zika. Ministère des solidarités et de la santé française. <https://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-infectieuses/virus-zika> Accessed 20/08/2019
- Ministère de la santé (II) Maladie à déclaration obligatoire – Zika. Ministère des solidarités et de la santé française. <https://www.service-public.fr/professionnels-entreprises/vosdroits/R44414> Accessed 18/03/2020
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, . . . Avsic Zupanc T (2016) Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine* 374(10):951-8 doi:10.1056/NEJMoa1600651
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427(6972):313-9 doi:10.1038/nature02165
- Modjarrad K, Lin L, George SL, Stephenson KE, Eckels KH, De La Barrera RA, . . . Michael NL (2018) Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Lancet* 391(10120):563-571
doi:10.1016/S0140-6736(17)33106-9
- Montoya M, Collins M, Dejnirattisai W, Katzelnick LC, Puerta-Guardo H, Jadi R, . . . Harris E (2018) Longitudinal Analysis of Antibody Cross-neutralization Following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas. *The Journal of infectious diseases* 218(4):536-545 doi:10.1093/infdis/jiy164
- Mossenta M, Marchese S, Poggianella M, Slon Campos JL, Burrone OR (2017) Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochemical and biophysical research communications* 492(4):579-586
doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.022
- Musso D, Gubler DJ (2016) Zika Virus. *Clinical microbiology reviews* 29(3):487-524
doi:10.1128/CMR.00072-15
- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, . . . Broult J (2014) Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 19(14) doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.14.20761
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM (2015) Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases* 21(2):359-61
doi:10.3201/eid2102.141363

N

- Nelson S, Jost CA, Xu Q, Ess J, Martin JE, Oliphant T, . . . Pierson TC (2008) Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization. *PLoS pathogens* 4(5):e1000060 doi:10.1371/journal.ppat.1000060
- Netto EM, Moreira-Soto A, Pedrosa C, Hoser C, Funk S, Kucharski AJ, . . . Drexler JF (2017) High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *mBio* 8(6) doi:10.1128/mBio.01390-17
- Nhan T, Cao-Lormeau V, Musso D (2014) Les infections à virus Zika. *REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES* 467

- Nicastri E, Castilletti C, Balestra P, Galgani S, Ippolito G (2016) Zika Virus Infection in the Central Nervous System and Female Genital Tract. *Emerging infectious diseases* 22(12):2228-2230 doi:10.3201/eid2212.161280
- Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, . . . Sawa H (2013) Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS nano* 7(5):3926-38 doi:10.1021/nn3057005
- Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR (2016) Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell stem cell* 18(5):591-6 doi:10.1016/j.stem.2016.03.012

O

- O'Donnell KL, Bixby MA, Morin KJ, Bradley DS, Vaughan JA (2017) Potential of a Northern Population of *Aedes vexans* (Diptera: Culicidae) to Transmit Zika Virus. *Journal of medical entomology* 54(5):1354-1359 doi:10.1093/jme/tjx087
- Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, . . . Ghawche F (2014) Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 19(9) doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720
- Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, . . . Schlumberger W (2018) Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases. *Advances in experimental medicine and biology* 1062:19-43 doi:10.1007/978-981-10-8727-1_3
- Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo (1981) Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75(3):389-93 doi:10.1016/0035-9203(81)90100-0
- Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, . . . Sestan N (2016) Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. *Cell reports* 16(10):2576-2592 doi:10.1016/j.celrep.2016.08.038

P

- Pagani I, Ghezzi S, Ulisse A, Rubio A, Turrini F, Garavaglia E, . . . Vicenzi E (2017) Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. *Scientific reports* 7:44286 doi:10.1038/srep44286
- PAHO (2016) Timeline of Emergence of Zika virus in the Americas. Pan American Health Organization (PAHO).
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en
 Accessed 19/06/2019
- PAHO (I) (2015) Epidemiological Alert. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. Pan American Health, Organization (PAHO) and World Health Organization (WHO).
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf> Accessed 16/07/2019

- PAHO (II) (2015) Epidemiological Update. Zika virus infection. Pan American Health, Organization (PAHO) and World Health Organization (WHO). <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/oct-16-cha-zika-virus-epi-update.pdf> Accessed 16/07/2019
- Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, . . . Weissman D (2017) Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature* 543(7644):248-251 doi:10.1038/nature21428
- Pardy RD, Richer MJ (2019) Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection. *Cells* 8(8) doi:10.3390/cells8080820
- Parke DW, 3rd, Almeida DR, Albin TA, Ventura CV, Berrocal AM, Mitra RA (2016) Serologically Confirmed Zika-Related Unilateral Acute Maculopathy in an Adult. *Ophthalmology* 123(11):2432-2433 doi:10.1016/j.ophtha.2016.06.039
- Pasquier C, Joguet G, Mengelle C, Chapuy-Regaud S, Pavili L, Prisant N, . . . Mansuy JM (2018) Kinetics of anti-ZIKV antibodies after Zika infection using two commercial enzyme-linked immunoassays. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 90(1):26-30 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.001
- Passos SRL, Borges Dos Santos MA, Cerbino-Neto J, Buonora SN, Souza TML, de Oliveira RVC, . . . Hokerberg YHM (2017) Detection of Zika Virus in April 2013 Patient Samples, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging infectious diseases* 23(12):2120-2121 doi:10.3201/eid2312.171375
- Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, . . . Isern S (2016) Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clinical & translational immunology* 5(12):e117 doi:10.1038/cti.2016.72
- Pavot V, Berthet M, Resseguier J, Legaz S, Handke N, Gilbert SC, . . . Verrier B (2014) Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine* 9(17):2703-18 doi:10.2217/nmm.14.156
- Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, . . . Sharp TM (2018) Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report. *The New England journal of medicine* 379(13):1234-1243 doi:10.1056/NEJMoa1613108
- Perera R, Khaliq M, Kuhn RJ (2008) Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral research* 80(1):11-22 doi:10.1016/j.antiviral.2008.05.004
- Pettersson JH, Bohlin J, Dupont-Rouzeyrol M, Brynildsrud OB, Alfsnes K, Cao-Lormeau VM, . . . Gould EA (2018) Re-visiting the evolution, dispersal and epidemiology of Zika virus in Asia. *Emerging microbes & infections* 7(1):79 doi:10.1038/s41426-018-0082-5
- Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, . . . Baud D (2018) Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: prospective cohort study in French Guiana. *Bmj* 363:k4431 doi:10.1136/bmj.k4431
- Pond WL (1963) Arthropod-Borne Virus Antibodies in Sera from Residents of South-East Asia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 57:364-71 doi:10.1016/0035-9203(63)90100-7
- Premkumar L, Collins M, Graham S, Liou GA, Lopez CA, Jadi R, . . . de Silva AM (2018) Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. *Journal of clinical microbiology* 56(3) doi:10.1128/JCM.01504-17
- Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, . . . Wrammert J (2016) Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

R

- Rey FA, Stiasny K, Vaney MC, Dellarole M, Heinz FX (2018) The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO reports* 19(2):206-224 doi:10.15252/embr.201745302
- Ribeiro GS, Kikuti M, Tauro LB, Nascimento LCJ, Cardoso CW, Campos GS, . . . Salvador Arboviral Research G (2018) Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? *The Lancet Global health* 6(2):e140-e141 doi:10.1016/S2214-109X(17)30496-5
- Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, . . . Diamond MS (2017a) Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell* 168(6):1114-1125 e10 doi:10.1016/j.cell.2017.02.017
- Richner JM, Jagger BW, Shan C, Fontes CR, Dowd KA, Cao B, . . . Diamond MS (2017b) Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* 170(2):273-283 e12 doi:10.1016/j.cell.2017.06.040
- Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, . . . Nussenzweig MC (2017) Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell* 169(4):597-609 e11 doi:10.1016/j.cell.2017.04.024
- Roby JA, Funk A, Khromykh AA (2012) *Flavivirus Replication and Assembly*. Caister Academic Press, Wymondham
- Rockstroh A, Moges B, Barzon L, Sinigaglia A, Palu G, Kumbukgolla W, . . . Ulbert S (2017) Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerging microbes & infections* 6(11):e99 doi:10.1038/emi.2017.87
- Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez WE, Franco-Paredes C (2016) The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel medicine and infectious disease* 14(3):177-9 doi:10.1016/j.tmaid.2016.05.004
- Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, Sok D, Beutler N, Strubel A, . . . Walker LM (2017) Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Science immunology* 2(14) doi:10.1126/sciimmunol.aan6809
- Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, . . . Weaver SC (2016) Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 94(6):1362-1369 doi:10.4269/ajtmh.16-0111
- Rothan HA, Bidokhti MRM, Byrareddy SN (2018) Current concerns and perspectives on Zika virus co-infection with arboviruses and HIV. *Journal of autoimmunity* 89:11-20 doi:10.1016/j.jaut.2018.01.002
- Ruchusatsawat K, Wongjaroen P, Posanacharoen A, Rodriguez-Barraquer I, Sangkitporn S, Cummings DAT, Salje H (2019) Long-term circulation of Zika virus in Thailand: an observational study. *The Lancet Infectious diseases* 19(4):439-446 doi:10.1016/S1473-3099(18)30718-7
- Ryckebusch F, Berthet M, Misse D, Choumet V (2017) Infection of a French Population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea Strain) with Zika Virus Reveals Low Transmission Rates to These Vectors' Saliva. *International journal of molecular sciences* 18(11) doi:10.3390/ijms18112384

S

- Saba Villarroel PM, Nurtop E, Pastorino B, Roca Y, Drexler JF, Gallian P, . . . de Lamballerie X (2018) Zika virus epidemiology in Bolivia: A seroprevalence study in volunteer blood donors. *PLoS neglected tropical diseases* 12(3):e0006239 doi:10.1371/journal.pntd.0006239
- Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, . . . Drebot M (2017) Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. *Emerging infectious diseases* 23(9):1577-1580 doi:10.3201/eid2309.162043
- Salvo MA, Kingstad-Bakke B, Salas-Quinchucua C, Camacho E, Osorio JE (2018) Zika virus like particles elicit protective antibodies in mice. *PLoS neglected tropical diseases* 12(2):e0006210 doi:10.1371/journal.pntd.0006210
- Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin C, Fox JM, Bombardi RG, . . . Crowe JE (2016) Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* 540(7633):443-447 doi:10.1038/nature20564
- Sariol CA, Nogueira ML, Vasilakis N (2018) A Tale of Two Viruses: Does Heterologous Flavivirus Immunity Enhance Zika Disease? *Trends in microbiology* 26(3):186-190 doi:10.1016/j.tim.2017.10.004
- Shim BS, Kwon YC, Ricciardi MJ, Stone M, Otsuka Y, Berri F, . . . Choe H (2019) Zika Virus-Immune Plasmas from Symptomatic and Asymptomatic Individuals Enhance Zika Pathogenesis in Adult and Pregnant Mice. *mBio* 10(4) doi:10.1128/mBio.00758-19
- Simon M. (2009) Immunologie. Cours Pharmacie. <https://www.cours-pharmacie.com/immunologie> Accessed 09/10/2019
- Simon O, Acket B, Forfait C, Girault D, Gourinat AC, Millon P, . . . Dupont-Rouzeyrol M (2018) Zika virus outbreak in New Caledonia and Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Journal of neurovirology* 24(3):362-368 doi:10.1007/s13365-018-0621-9
- Simonin Y, Loustalot F, Desmetz C, Foulongne V, Constant O, Fournier-Wirth C, . . . Salinas S (2016) Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* 12:161-169 doi:10.1016/j.ebiom.2016.09.020
- Simonin Y, van Riel D, Van de Perre P, Rockx B, Salinas S (2017) Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. *PLoS neglected tropical diseases* 11(9):e0005821 doi:10.1371/journal.pntd.0005821
- Simpson DI (1964) Zika Virus Infection in Man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58:335-8
- Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ (2016) The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352(6284):467-70 doi:10.1126/science.aaf5316
- Sirohi D, Kuhn RJ (2017) Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of infectious diseases* 216(suppl_10):S935-S944 doi:10.1093/infdis/jix515
- Slavov SN, Ferreira FU, Rodrigues ES, Gomes R, Covas DT, Kashima S (2019) Simultaneous zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit. *Journal of vector borne diseases* 56(2):166-169 doi:10.4103/0972-9062.263724
- Sloan A, Safronetz D, Makowski K, Barairo N, Ranadheera C, Dimitrova K, . . . Kadkhoda K (2018) Evaluation of the Diasorin Liaison(R) XL Zika Capture IgM CMIA for Zika virus serological testing. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 90(4):264-266 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.018
- Smithburn KC (1954) Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of

- long-time residents of Malaya and Borneo. *American journal of hygiene* 59(2):157-63 doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119630
- Smithburn KC, Kerr JA, Gatne PB (1954a) Neutralizing antibodies against certain viruses in the sera of residents of India. *Journal of immunology* 72(4):248-57
- Smithburn KC, Taylor RM, Rizk F, Kader A (1954b) Immunity to certain arthropod-borne viruses among indigenous residents of Egypt. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 3(1):9-18 doi:10.4269/ajtmh.1954.3.9
- Sola L, Gagni P, D'Annessa I, Capelli R, Bertino C, Romanato A, . . . Cretich M (2018) Enhancing Antibody Serodiagnosis Using a Controlled Peptide Coimmobilization Strategy. *ACS infectious diseases* 4(6):998-1006 doi:10.1021/acsinfecdis.8b00014
- Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, . . . Schlumberger W (2016) Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 21(50) doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426
- Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, . . . Corti D (2016) Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* 353(6301):823-6 doi:10.1126/science.aaf8505
- Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte EN, . . . Baric RS (2016) Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *mBio* 7(4) doi:10.1128/mBio.01123-16
- Sze A, Olganier D, Hadj SB, Han X, Tian XH, Xu HT, . . . Lin R (2017) Sophoraflavenone G Restricts Dengue and Zika Virus Infection via RNA Polymerase Interference. *Viruses* 9(10) doi:10.3390/v9100287

T

- Tai W, Chen J, Zhao G, Geng Q, He L, Chen Y, . . . Du L (2019) Rational Design of Zika Virus Subunit Vaccine with Enhanced Efficacy. *Journal of virology* 93(17) doi:10.1128/JVI.02187-18
- Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, . . . Maslow JN (2017) Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine - Preliminary Report. *The New England journal of medicine* doi:10.1056/NEJMoa1708120
- Theel ES, Hata DJ (2018) Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. *Journal of clinical microbiology* 56(4) doi:10.1128/JCM.01972-17
- Theillet G, Grard G, Galla M, Maise C, Enguehard M, Cresson M, . . . Bedin F (2019) Detection of chikungunya virus-specific IgM on laser-cut paper-based device using pseudo-particles as capture antigen. *Journal of medical virology* 91(6):899-910 doi:10.1002/jmv.25420
- Theillet G, Rubens A, Foucault F, Dalbon P, Rozand C, Leparac-Goffart I, Bedin F (2018) Laser-cut paper-based device for the detection of dengue non-structural NS1 protein and specific IgM in human samples. *Archives of virology* 163(7):1757-1767 doi:10.1007/s00705-018-3776-z
- Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, . . . Fernandez J (2016) A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of virology* 161(3):665-8 doi:10.1007/s00705-015-2695-5
- Tsai WY, Youn HH, Brites C, Tsai JJ, Tyson J, Pedrosa C, . . . Wang WK (2017) Distinguishing Secondary Dengue Virus Infection From Zika Virus Infection With

Previous Dengue by a Combination of 3 Simple Serological Tests. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 65(11):1829-1836 doi:10.1093/cid/cix672

U

UniProt (2016) UniProtKB - Q32ZE1 (POLG_ZIKV), Polyprotéine du virus Zika, Numéro d'accèsion : Q32ZE1. UniProt.
https://www.uniprot.org/uniprot/Q32ZE1#PRO_0000435829 Accessed 22/08/2019

V

van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barkovich AJ, Junior HV, Filho EL, . . . Moore CA (2016) Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 65(47):1343-1348
doi:10.15585/mmwr.mm6547e2

Van Dyne EA, Neaterour P, Rivera A, Bello-Pagan M, Adams L, Munoz-Jordan J, . . . Sharp TM (2019) Incidence and Outcome of Severe and Nonsevere Thrombocytopenia Associated With Zika Virus Infection-Puerto Rico, 2016. *Open forum infectious diseases* 6(1):ofy325 doi:10.1093/ofid/ofy325

Ventura LO, Ventura CV, Lawrence L, van der Linden V, van der Linden A, Gois AL, . . . Miller MT (2017) Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 21(4):295-299 e2 doi:10.1016/j.jaapos.2017.04.003

ViralZone ExPASy Zika virus. ViralZone ExPASy. <https://viralzone.expasy.org/6756>
Accessed 06/03/2020

W

Wahala WM, Kraus AA, Haymore LB, Accavitti-Loper MA, de Silva AM (2009) Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody. *Virology* 392(1):103-113 doi:10.1016/j.virol.2009.06.037

Wang J, Bardelli M, Espinosa DA, Pedotti M, Ng TS, Bianchi S, . . . Corti D (2017) A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential. *Cell* 171(1):229-241 e15 doi:10.1016/j.cell.2017.09.002

Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, . . . Cheng G (2016a) From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell host & microbe* 19(5):561-569 doi:10.1016/j.chom.2016.04.006

Wang Q, Yang H, Liu X, Dai L, Ma T, Qi J, . . . Gao GF (2016b) Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Science translational medicine* 8(369):369ra179 doi:10.1126/scitranslmed.aai8336

Wang X, Tai W, Zhang X, Zhou Y, Du L, Shen C (2019) Effects of Adjuvants on the Immunogenicity and Efficacy of a Zika Virus Envelope Domain III Subunit Vaccine. *Vaccines* 7(4) doi:10.3390/vaccines7040161

Warnecke JM, Lattwein E, Saschenbrecker S, Stocker W, Schlumberger W, Steinhagen K (2019) Added value of IgA antibodies against Zika virus non-structural protein 1 in the diagnosis of acute Zika virus infections. *Journal of virological methods* 267:8-15

- doi:10.1016/j.jviromet.2019.02.005
- Wen J, Elong Ngono A, Regla-Nava JA, Kim K, Gorman MJ, Diamond MS, Shresta S (2017) Dengue virus-reactive CD8(+) T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. *Nature communications* 8(1):1459 doi:10.1038/s41467-017-01669-z
- WHO (2018) Zika virus. World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus> Accessed 20/08/2019
- WHO (I) (2016) Zika situation report - Neurological syndrome and congenital anomalies. World Health Organization (WHO). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204348/zikasitrep_5Feb2016_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y Accessed 15/01/2018
- WHO (II) (2016) Zika virus infection – Chile, Emergencies preparedness. World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/csr/don/15-april-2016-zika-chile/en/> Accessed 10/07/2019
- WHO (III) (2016) Laboratory testing for Zika virus infection, Interim guidance. World Health Organization (WHO). https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf;jsessionid=C70DA120A03A9AB931104D54D3E7CFF6?sequence=1 Accessed 08/02/2018
- WHO vaccine WHO vaccine pipeline tracker. World Health Organization (WHO). https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/ Accessed 19/03/2020
- Willis E, Hensley SE (2017) Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. *Virology* 508:1-6 doi:10.1016/j.virol.2017.04.031
- Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA (2016) Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 388(10045):717-27 doi:10.1016/S0140-6736(16)00339-1
- Wood PDP (1967) Algebraic Model of the Lactation Curve in Cattle. *Nature* 216(Octobre 14)
- WRBU Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). <http://www.wrbu.org/> Accessed 08/07/2019
- Wu P, Yu X, Wang P, Cheng G (2019) Arbovirus lifecycle in mosquito: acquisition, propagation and transmission. *Expert reviews in molecular medicine* 21:e1 doi:10.1017/erm.2018.6
- Wu Y, Li S, Du L, Wang C, Zou P, Hong B, . . . Ying T (2017) Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. *Emerging microbes & infections* 6(10):e89 doi:10.1038/emi.2017.79

X

- Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, . . . Tang H (2016a) Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. *Nature medicine* 22(10):1101-1107 doi:10.1038/nm.4184
- Xu X, Song H, Qi J, Liu Y, Wang H, Su C, . . . Gao GF (2016b) Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *The EMBO journal* 35(20):2170-2178 doi:10.15252/embj.201695290

Y

- Yang M, Dent M, Lai H, Sun H, Chen Q (2017) Immunization of Zika virus envelope protein

- domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine* 35(33):4287-4294 doi:10.1016/j.vaccine.2017.04.052
- Yang S, Onigman P, Wu WW, Sjogren J, Nyhlen H, Shen RF, Cipollo J (2018) Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment. *Analytical chemistry* 90(13):8261-8269 doi:10.1021/acs.analchem.8b01834
- Yepez JB, Murati FA, Pettito M, Penaranda CF, de Yepez J, Maestre G, . . . Johns Hopkins Zika C (2017) Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Syndrome in Colombia and Venezuela. *JAMA ophthalmology* 135(5):440-445 doi:10.1001/jamaophthalmol.2017.0561
- Yu L, Wang R, Gao F, Li M, Liu J, Wang J, . . . Zhang L (2017) Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection. *JCI insight* 2(12) doi:10.1172/jci.insight.93042
- Yun SI, Lee YM (2017) Zika virus: An emerging flavivirus. *Journal of microbiology* 55(3):204-219 doi:10.1007/s12275-017-7063-6

Z

- Zanluca C, Dos Santos CN (2016) Zika virus - an overview. *Microbes and infection* 18(5):295-301 doi:10.1016/j.micinf.2016.03.003
- Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K (2015) First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110(4):569-72 doi:10.1590/0074-02760150192
- Zhang S, Bovshik EI, Maillard R, Gromowski GD, Volk DE, Schein CH, . . . Beasley DW (2010) Role of BC loop residues in structure, function and antigenicity of the West Nile virus envelope protein receptor-binding domain III. *Virology* 403(1):85-91 doi:10.1016/j.virol.2010.03.038
- Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, . . . Fremont DH (2016) Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell* 166(4):1016-1027 doi:10.1016/j.cell.2016.07.020
- Zhao LZ, Hong WX, Wang J, Yu L, Hu FY, Qiu S, . . . Zhang FC (2019) Kinetics of antigen-specific IgM/IgG/IgA antibody responses during Zika virus natural infection in two patients. *Journal of medical virology* 91(5):872-876 doi:10.1002/jmv.25366
- Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJ, Neyts J (2016) The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS neglected tropical diseases* 10(5):e0004695 doi:10.1371/journal.pntd.0004695
- Zompi S, Montoya M, Pohl MO, Balmaseda A, Harris E (2012) Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS neglected tropical diseases* 6(3):e1568 doi:10.1371/journal.pntd.0001568

Titre : Discrimination sérologique de *Flavivirus*, étude du domaine III de la protéine d'enveloppe du virus Zika comme cible d'anticorps spécifiques.

Mots clés : Virus Zika, Sérodiagnostic, Sérocroisement, Protection immunitaire, Cinétique immunitaire humorale

Résumé : Le virus Zika fait partie du genre des *Flavivirus* comme le virus de la dengue. Ils sont transmis par les moustiques du genre *Aedes*. En 2015, une épidémie a causé plus de 700 000 infections, à l'origine de microcéphalies chez les fœtus et de syndromes de Guillain-Barré. Pour la première fois, la transmission d'un arbovirus par voie sexuelle est mise en évidence. Les *Flavivirus* co-circulent dans de nombreux pays, parfois de façon concomitante. Leurs infections induisent des anticorps capables de reconnaître différents *Flavivirus*. Cette réactivité croisée peut conduire, en fonction de leur concentration et de leur affinité à une séroneutralisation virale croisée ou au contraire aggraver la pathologie liée à une seconde infection. Deux problématiques dues à cette réaction croisée apparaissent, (i) il est difficile de rendre un sérodiagnostic fiable et (ii) un vaccin pourrait induire, au contraire d'une protection, une aggravation des pathologies.

Au cours de ces travaux, nous avons évalué la fiabilité de reconnaissance du domaine III de la protéine d'enveloppe

du virus Zika par les anticorps qu'une infection virale induit chez l'homme. Ce domaine porte des épitopes reconnus spécifiquement par des IgG produits lors d'une infection par ce virus ce qui en fait un marqueur spécifique. L'ELISA mis au point a une sensibilité de 92% et une spécificité de 90%. Avec cet outil nous avons diagnostiqué un cas ancien présent dans une zone pré-épidémique ainsi qu'un cas autochtone dans le sud de la France en 2019. Le suivi de la cinétique d'apparition et de disparition des IgM et des IgG de patients pendant une année nous a permis d'estimer une fenêtre d'utilisation de notre diagnostic, tout en caractérisant les réponses immunitaires humorales liées à l'intensité des infections, la gravité de la pathologie ainsi que la présence d'une cicatrice sérologique. Enfin, l'étude d'anticorps induits par ce domaine complexé à une nanoparticule dans un modèle animal a montré un fort pouvoir adjuvant de ces nanoparticules ainsi qu'une reconnaissance spécifique du virus Zika.

Title : *Flavivirus* serological discrimination, study of the Zika virus envelope protein domain III as a target for specific antibodies.

Keywords : Zika virus, serodiagnosis, cross-reaction, immune protection, humoral immune kinetic

Abstract : The Zika virus, like the dengue virus, is a *Flavivirus* and both are transmitted by *Aedes* mosquitoes. In 2015, an epidemic caused more than 700,000 infections, leading to foetal microcephaly and Guillain Barré syndrome. In addition, sexual transmission of the Zika virus was demonstrated for the first time. Flaviviruses co-circulate in many countries, sometimes concomitantly. Infections with Flaviviruses induce cross-reacting antibodies, leading to cross-neutralization or, on the contrary, worsening of the disease following a second infection, depending on their concentration and affinity. Such cross-reaction leads to two principle problems: (i) it is difficult to make a reliable serodiagnosis and (ii) a vaccine may aggravate the disease instead of providing protection.

Here, we evaluated the reliability of antibodies induced during human infections to recognise envelope protein domain III of the Zika virus. This domain carries epitopes

recognized by the IgG produced during a Zika virus infection, making it a specific marker. An ELISA developed to detect this domain shows 92% sensitivity and 90% specificity. We used this tool to diagnose an old case from a pre-epidemic area as well as an indigenous case from the south of France in 2019. Monitoring the kinetics of the appearance and disappearance of IgM and IgG in the blood of patients for one year allowed us to estimate the window of use for our diagnostic tool, while characterizing the humoral immune responses linked to the epidemic and the severity of the disease, as well as the presence of a serological scar. Finally, the study of antibodies induced by this domain complexed to nanoparticles in an animal model showed such nanoparticles to be a strong adjuvant and the antibodies to specifically recognize the Zika virus.