

INTRODUCTION

I. Les arbovirus

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus, mais qu'est-ce un « arbovirus » ? Le terme « Arbovirus » provient de la contraction de l'anglais « ARthropod-BORne VIRUSes ». Ce terme rassemble des virus classés dans différentes familles comme les agents de la fièvre jaune, de la dengue (famille des *Flaviviridae*) et du chikungunya (famille des *Togaviridae*). Un arbovirus est donc un virus ayant pour vecteur un arthropode, souvent hématophage tel que les tiques, les moustiques et d'autres insectes piqueurs (exception faite des insectes suceurs de sève et autres phytophages).

Ces arthropodes hématophages jouent le rôle de vecteurs biologiques, c'est-à-dire permettant la multiplication du virus avant de le transmettre au cours d'un repas sanguin.

Les arbovirus sont donc par définition forcément associés à un arthropode et capables d'infecter des hôtes très variés (arthropode et hôte vertébré réservoir au minimum) (figure 1). Ils semblent avoir une grande facilité à franchir la barrière d'espèce (1).

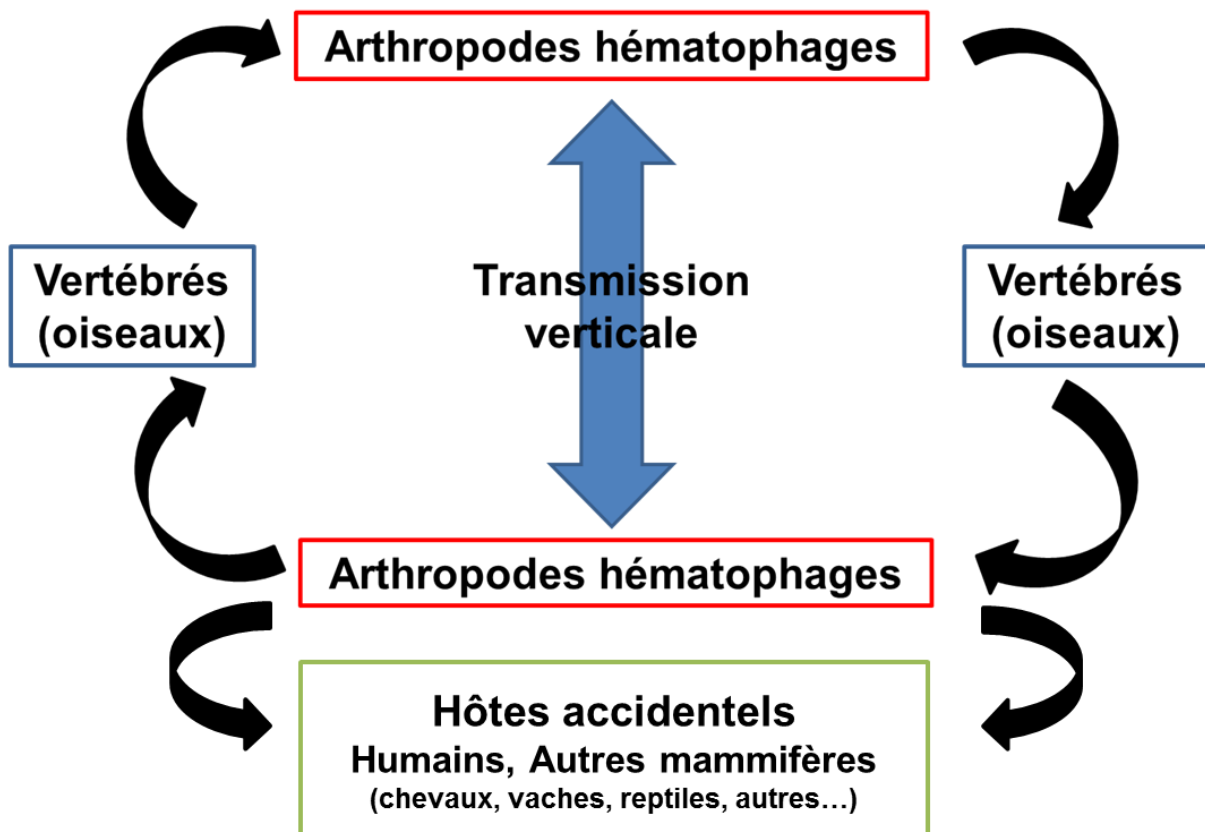
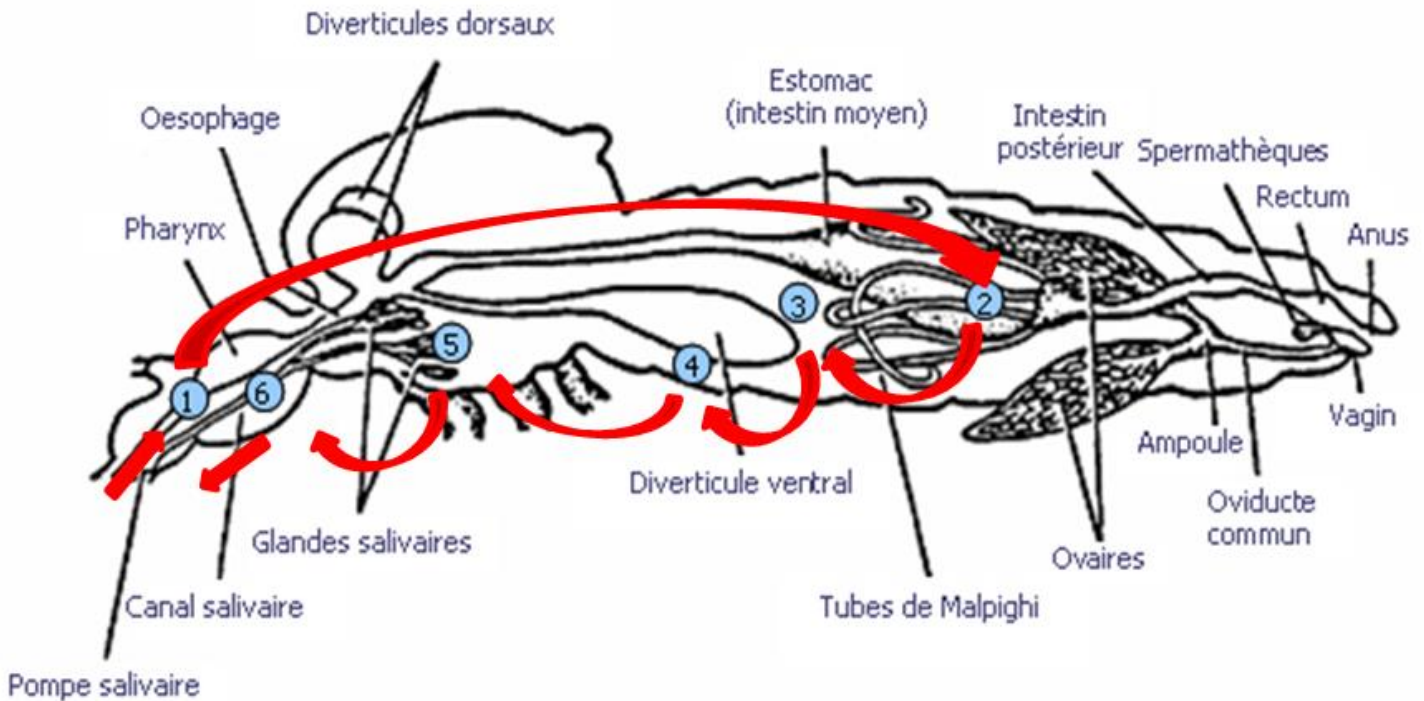


Figure 1 : Cycle épidémiologique d'un arbovirus

La relation virus vecteur est complexe comme le montre l'exemple ci-dessous (figure 2).



- 1) Le repas de sang infectant est ingéré
- 2) Le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales de l'estomac;
- 3) Le virus quitte les cellules épithéliales de l'estomac;
- 4) Le virus infecte et se réplique dans les cellules du tissu adipeux;
- 5) Le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales des glandes salivaires (et dans d'autres tissus);
- 6) Le virus est libéré dans la salive avec laquelle il sera transmis lors du prochain repas sanguin

Figure 2 : Etapes de la dissémination d'un arbovirus : exemple du virus de la dengue, chez un arthropode hématoophage, le moustique.

Une condition pour qu'un virus puisse être transmis par un vecteur hématoophage est de provoquer une phase de virémie chez le vertébré. Celle-ci doit répondre à deux critères : être suffisamment élevée et prolongée dans le temps (figure 3).

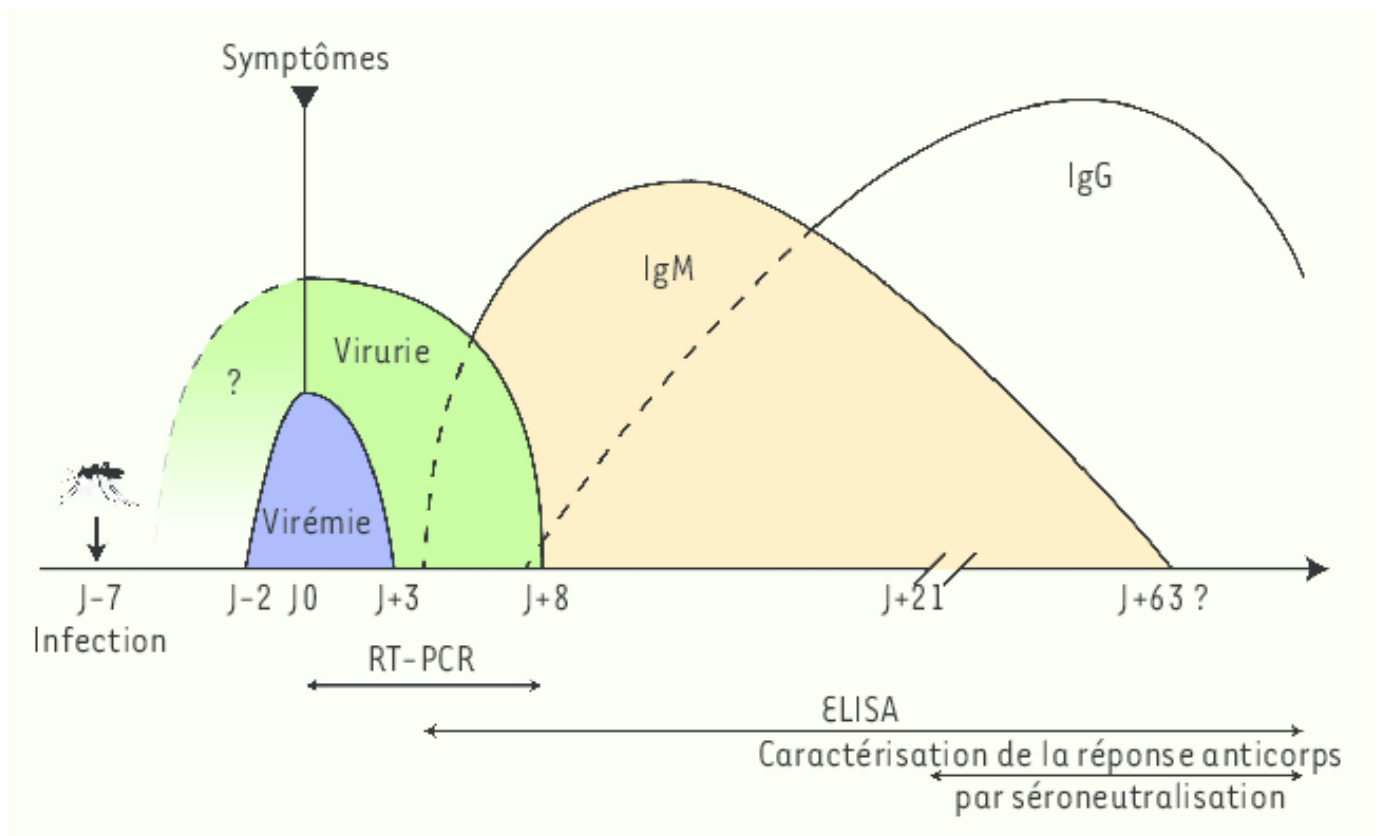


Figure 3 : Cinétique de marqueurs biologiques (virologiques et sérologiques) de l'infection à virus Zika: Support diagnostique (adapté du Centre National de Référence). Ig(M ou G) : immunoglobulines (M ou G) ; J ± n : jour par rapport à l'apparition des symptômes ; RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction (2).

Mais la bonne réalisation des phénomènes décrits en figure 2 demande du temps : après s'être gorgé sur un vertébré virémique, l'arthropode ne sera infectant (c'est-à-dire que sa salive contiendra des virions) que 6 à 8 jours plus tard - cette période d'incubation dite extrinsèque est variable suivant le virus, l'arthropode, et les conditions environnementales. Cela signifie que, pour avoir une bonne capacité vectorielle, l'insecte en question devra survivre suffisamment longtemps (3). L'infection du moustique par le VWN affecte la reproduction du moustique de manière négative mais augmente son appétit favorisant ainsi sa capacité vectorielle (4). De même, *Plasmodium spp.* réduit la survie et la fécondité des moustiques vecteurs, suggérant un effet direct du pathogène sur son vecteur (5, 6). Cependant, Anderson et al. (2000) (7) ont montré que les *Anopheles gambiae* porteurs de *P. falciparum* ont une augmentation de leur taux de mortalité. En effet les moustiques porteurs de *P.falciparum* passent plus de temps à se nourrir sur un nombre d'hôtes plus important, s'exposant ainsi à plus de risque d'être écrasé par l'hôte incommodé. Pour un virus donné, des populations différentes d'un même moustique peuvent présenter des degrés variés de compétence vectorielle (aptitude intrinsèque d'un arthropode à acquérir un virus lors d'un repas sanguin, en assurer la multiplication et/ou le développement et le transmettre à un hôte vertébré).

Il s'agit, en fait, d'une modulation de l'infection virale chez l'insecte, aboutissant à l'installation d'un certain état d'équilibre. Si la compétence est trop forte, il y a risque d'emballement du système; si elle est trop faible, on aboutit à l'arrêt de la transmission.

L'ensemble de ces relations intrinsèques et extrinsèques est aussi appelé « fitness » de l'hôte par rapport au virus.

On conçoit alors que le rôle de l'insecte ne se limite pas à la simple transmission du virus. L'insecte peut assurer aussi son amplification, son passage d'une espèce-hôte à une autre, sa maintenance dans le foyer, sa persistance durant l'hiver ou la saison sèche.

Les arbovirus sont actuellement des virus d'importance majeure en santé publique au niveau mondial. On estime qu'aujourd'hui plus de 70 % des virus de plantes et quelque 40 % des virus de mammifères ont des arthropodes comme vecteurs. Les arbovirus semblent tirer parfaitement profit des possibilités offertes par leurs vecteurs que ce soit en termes de propagation multi espèces ou de maintien dans le temps et l'écosystème. Une étude suggère même que les premières relations entre les virus et les arthropodes remonteraient à quelques 200 millions d'années (8).

Les virus font souvent montre d'une adaptation extrême qui les rend spécifiques d'un hôte ou d'un type d'hôte, ainsi certains virus ne touchent que les mammifères, les oiseaux, ou les insectes sans jamais franchir la barrière d'espèce. C'est le cas pour certains flavivirus récemment découverts (9, 10), limités à l'espèce d'arthropode hôte où ils ont été découverts.

Certains flavivirus arrivent cependant à franchir la barrière d'espèce (DENV, VWN, ZIKA, etc..) qui peuvent passer de l'arthropode à l'oiseau, ou au mammifère (11). Franchir la barrière d'espèce et s'adapter à un nouvel hôte a un coût, nécessite du temps et le franchissement de nombreux obstacles, tels que l'interaction avec de nouvelles cellules cibles, l'échappement au système immunitaire et aux mécanismes de défense cellulaire (12). Avoir un vecteur permettant au virus de multiplier ses tentatives d'adaptation est important pour faciliter la réussite d'événements d'infection chez une nouvelle espèce hôte. Au vu des découvertes récentes sur l'existence de flavivirus exclusivement limités à des arthropodes, et de l'existence de nombreux flavivirus pouvant infecter plusieurs espèces vertébrées et invertébrées, on peut émettre l'hypothèse que les arbovirus sont à l'origine des virus d'insectes qui ont réussi à s'adapter et franchir la barrière d'espèce avec le concours de leurs vecteurs hématophages ou phytopages.

Il est important de noter l'émergence et/ou une réémergence de divers arbovirus sur des territoires où ils n'avaient pas encore été identifiés ou dont ils avaient apparemment disparu

depuis des décennies. Ces virus circulent au sein d'un réservoir animal sauvage et beaucoup d'entre eux peuvent être transmis accidentellement à des animaux domestiques et à l'homme.

Chez l'homme, bien qu'elles soient le plus souvent asymptomatiques, les arboviroses peuvent provoquer, plus ou moins fréquemment, des encéphalites avec de graves séquelles neurologiques, des arthralgies handicapantes ou des fièvres hémorragiques. Les premières peuvent se traduire également par des affections neurologiques chez les équidés avec un taux de létalité relativement élevé.

Leur expansion s'inscrit dans le cadre plus large de celle de nombreuses maladies à transmission vectorielle qui affectent de façon croissante les populations animales et humaines depuis une trentaine d'années, parallèlement au développement des transports modernes, de l'urbanisation et à la mondialisation, ainsi qu'aux changements climatiques.

Les récentes épizooties apparues à travers le monde ces dernières années et en 2015, tels que la dengue, Zika, West Nile, en sont de parfaits exemples (13, 14).

Nous allons nous intéresser tout particulièrement au virus West Nile.

II. Le virus West Nile (VWN)

a. Épidémiologie

Le virus West Nile (VWN) est un arbovirus transmis par piqûre de moustique.

Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus* et est responsable de la fièvre West Nile ou fièvre du Nil occidental. Le VWN est transmis principalement par des moustiques du genre *Culex* et amplifié selon un cycle enzootique moustiques-oiseaux. Le réservoir naturel du VWN est composé par la faune aviaire sauvage. Il peut infecter une grande variété d'espèces animales mais les hôtes mammifères représentent souvent un cul-de-sac épidémiologique, c'est à dire qu'ils ne sont infectés qu'occasionnellement et qu'il n'y a pas de transmission secondaire.

Le VWN a été identifié pour la première fois en 1937, lorsqu'il a été isolé en Ouganda, dans la province du Nil Occidental (15), à partir du sang d'une malade (16). Initialement, la fièvre West Nile était considérée comme une arbovirose mineure, responsable chez l'homme d'infections asymptomatiques ou d'un syndrome pseudo-grippal et plus rarement d'encéphalites pouvant être mortelles. Son statut est remis en cause à la fin des années 1990 avec des épidémies incluant de nombreux cas humains, comme en Algérie (1994), en Roumanie (1996), en Tunisie (1997), en Israël (2000), et des cas équins au Maroc (1996), Italie (1998), Israël et France (2000) (17). Une épidémie majeure éclate à New York en 1999, sur un territoire vierge de VWN. Après bientôt 20 ans, le VWN est endémique sur tout le territoire nord-américain et à la frontière

canadienne. Près de 46000 cas humains de méningites ou d'encéphalites dont plus de 2000 infections fatales y ont été répertoriés. Une mortalité massive de la faune aviaire locale y a aussi été observée (18). La souche isolée à New York est très proche de celle isolée en 1998 sur une cigogne en Israël, elle diffère par 28 changements nucléotidiques impliquant 10 changements d'acides aminés (19). Récemment, des virus proches et transmis par des moustiques *Culex* ont été identifiés en Europe: le virus Usutu (USUV), rencontré jusque-là en Afrique, a été isolé en Europe centrale (Autriche, Hongrie,...) et occidentale (Espagne) et a récemment causé des épizooties associées à des épisodes de mortalité dans l'avifaune sauvage et de parc zoologique en France (20-25); un nouveau virus émergent, le virus Bagaza (BAGV), a été identifié en Espagne en 2010 (26).

Parmi les mammifères, l'Homme et les équidés sont les plus sensibles à l'infection par le VWN, il peut causer chez eux dans 1-10% des cas des infections neurologiques graves. Il circule de façon enzootique en Afrique, en Australie et en Asie, alors que dans le reste du monde, notamment en Europe et en Amérique du Nord, il provoque régulièrement des cas chez l'homme et le cheval.

En Europe, même si la situation n'a rien de comparable avec la spectaculaire épidémie/épizootie nord-américaine enregistrée à partir de 1999, la circulation du VWN s'est intensifiée depuis 2008 avec des cas cliniques humains enregistrés dans 11 pays en 2012 (27) (figure 4).

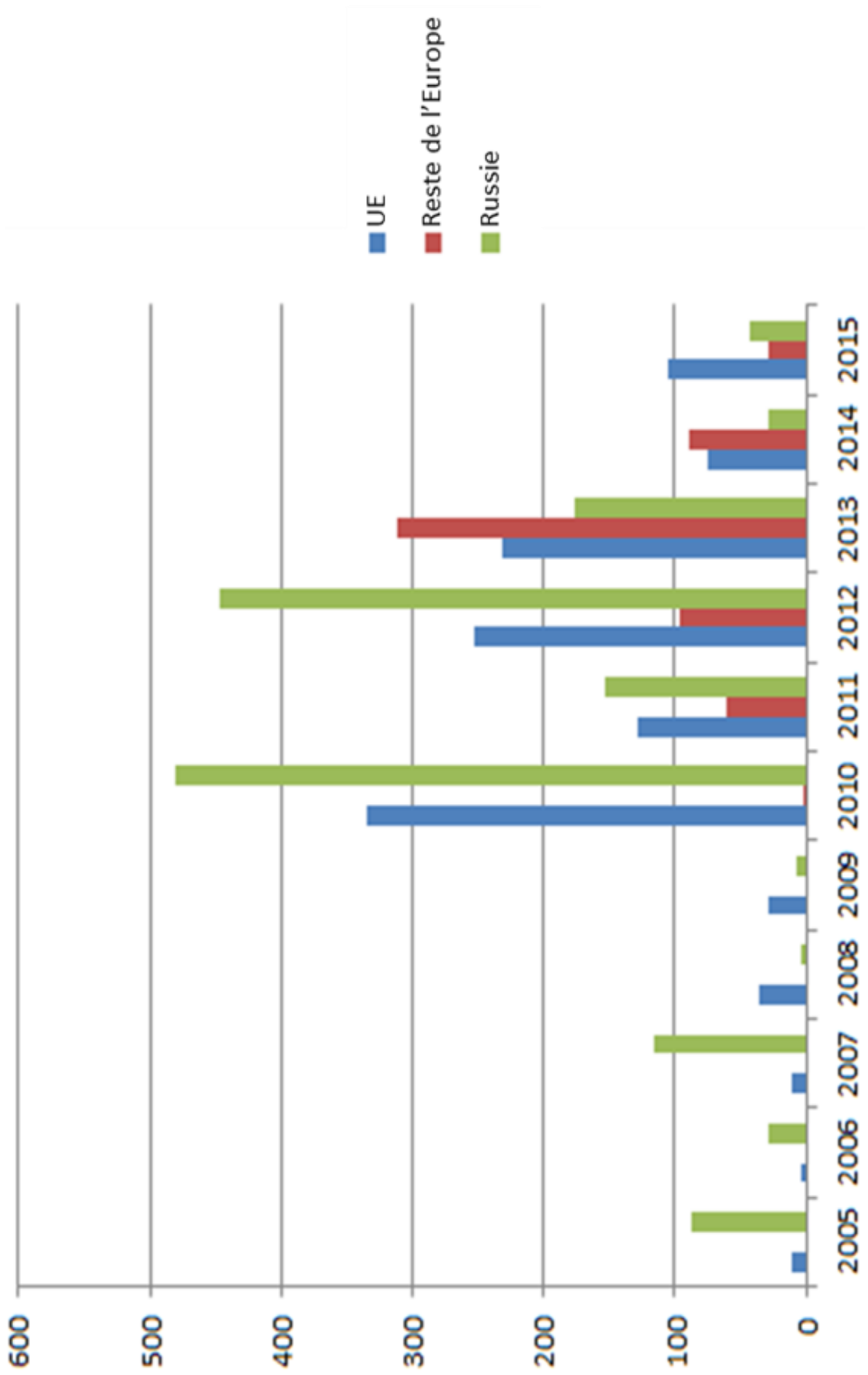


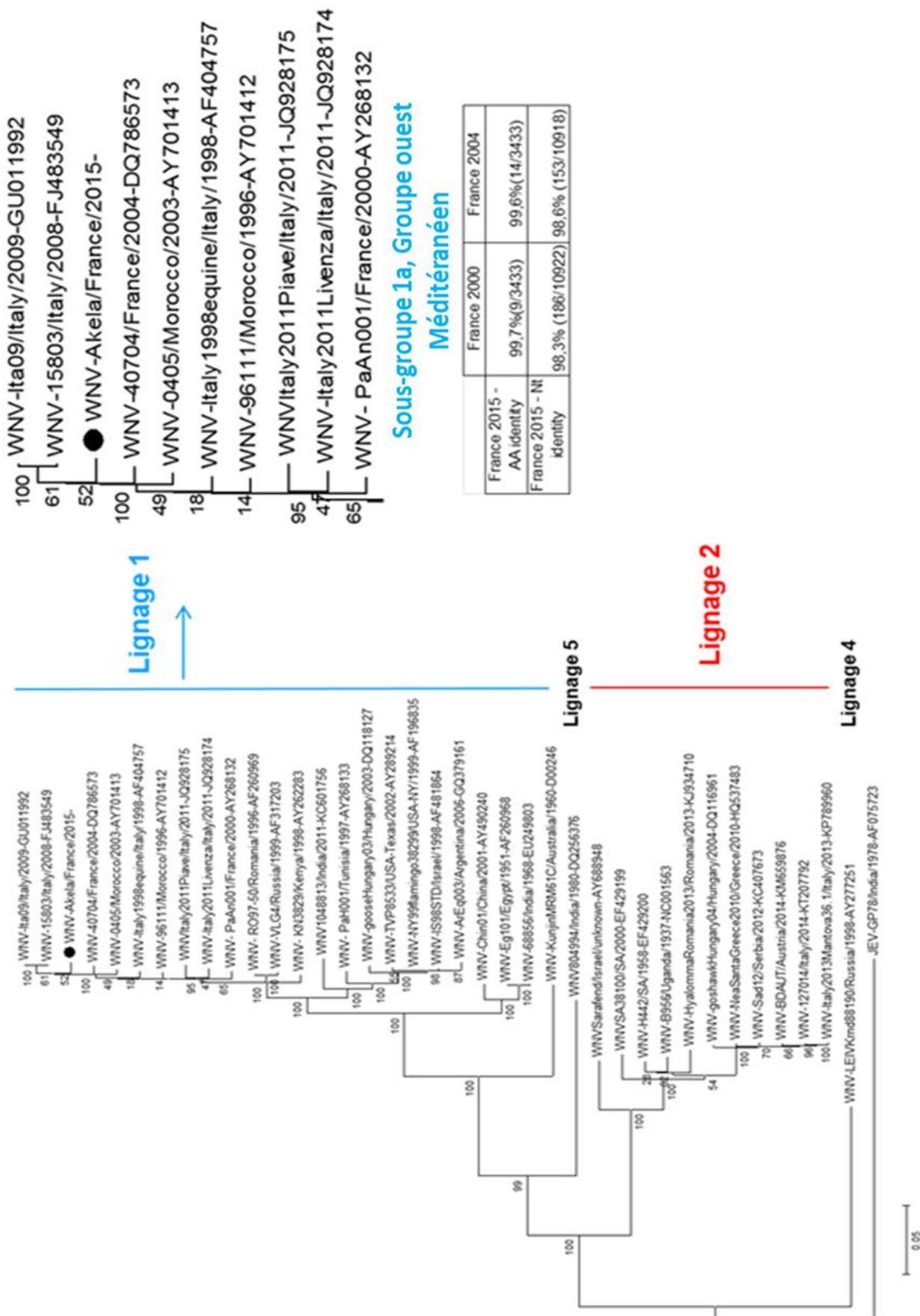
Figure 4 : Nombre de cas humains d'infection à VWN (formes neuroinvasives graves) déclarés par année en Europe et en Russie (Source : ECDC) (28)

b. Classification virale

Une grande diversité de souches est responsable des foyers répertoriés en Europe (les souches pathogènes appartiennent au lignage 1 et 2 et l'ensemble des souches répertoriées appartiennent à plus de 5 lignages génétiques différents), à l'opposé du territoire américain où une seule souche de lignage 1 a été importée (29) (figure 5).

Chaque année entre 2008 et 2014, de nouveaux territoires européens ont été trouvés infectés, en Italie, en Grèce et plus largement dans la région des Balkans. L'émergence de nouvelles souches virales pathogènes, de lignage 1 et de lignage 2, sur ces dernières années, semble indiquer une intensification des introductions de virus West Nile en Europe (28).

L'épidémiologie du virus West Nile en Europe a donc récemment évolué avec l'émergence de souches de lignage 2 (Hongrie, 2004 et Roumanie, 2010), associées à l'expansion des aires de distribution de ces virus, et l'endémisation de virus de lignage 1 en Europe occidentale (Italie, Espagne) (28). Longtemps considéré faiblement pathogène, le lignage 2 est depuis 2008 associé à un nombre croissant de cas neuroinvasifs équin et humains (Hongrie 2008, Grèce 2010, Russie 2010,...)(30-32).



Analyses phylogénétiques avec : MEGA6 (Neighbor-Joining, Jukes-Cantor)

Figure 5 : Arbre phylogénétique du WNV (Communication orale S.Lecollinet, International Equine Infectious Disease Conference, Buenos Aires, 2016)

c. La particule virale

Le VWN est un virus enveloppé avec une capsidie formée d'une seule protéine, la protéine C, contenant une molécule d'ARN de polarité positive (ARN(+)) d'environ 11kb (kilobase). L'enveloppe virale empruntée aux membranes internes de la cellule hôte (membranes du réticulum endoplasmique (RE)) comporte deux protéines structurales : une protéine d'enveloppe (E) et une protéine de membrane (M). Ci-dessous la représentation schématique de la structure des particules virales dont l'agencement confère une apparence lisse au virion mature (figure 6A), ainsi que des images de cryo-microscopie électronique révélant des particules virales de symétrie icosaédrique de 50 nm de diamètre, sans spicules à leur surface (figure 6B) (16).

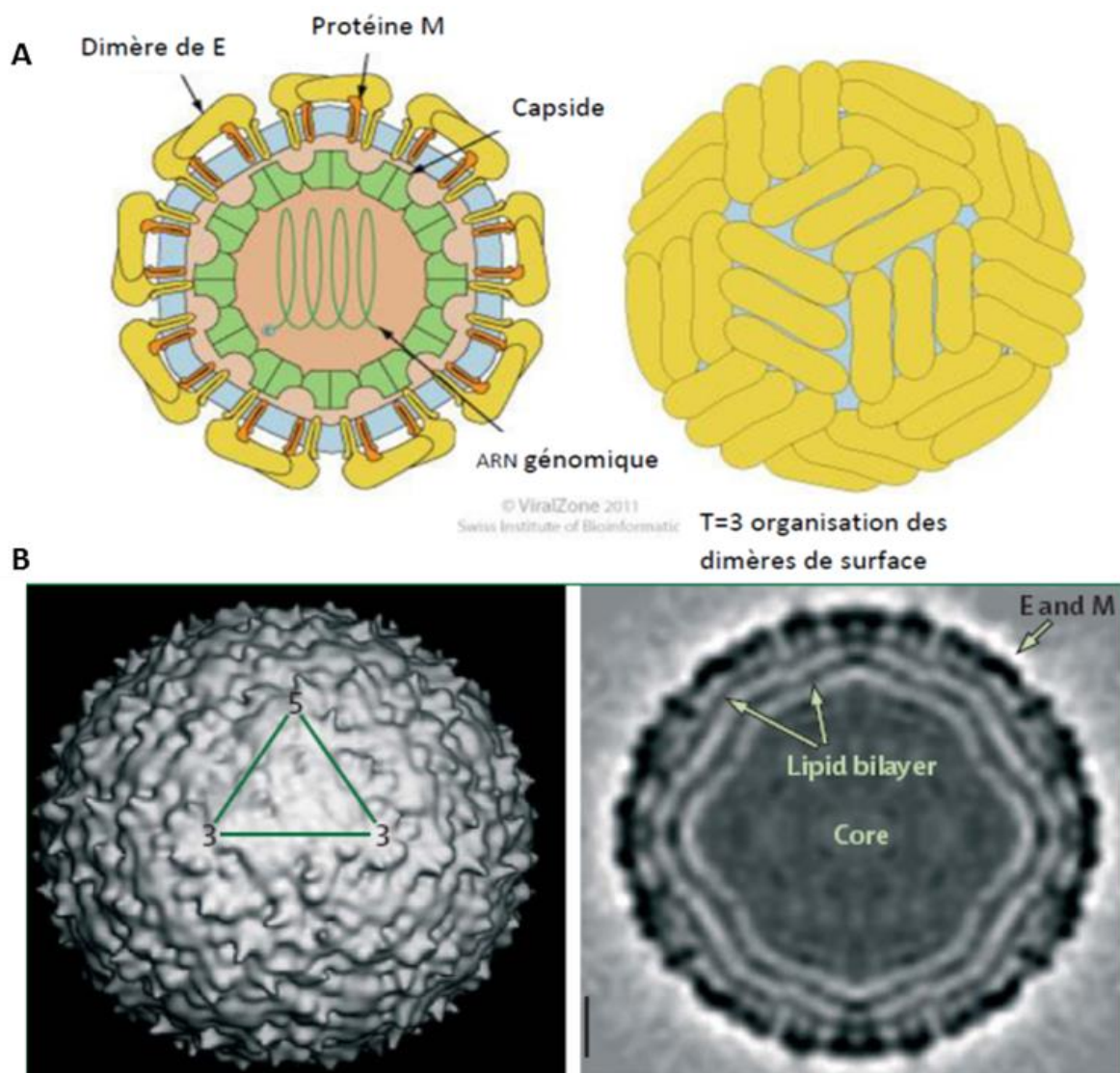


Figure 6: (A) Représentation schématique de la structure des particules virales (d'après <http://viralzone.expasy.org>). (B) Cryo-microscopie électronique de particules du virus West Nile (d'après (16)).

A gauche, la représentation des protéines d'enveloppe et de membrane à la surface de la particule virale. Les protéines de capsidie forment une structure protégeant l'ARN viral. La structure du virion est reconstituée d'après les données de cryo-microscopie électronique. Le triangle à la surface de la structure indique une unité asymétrique d'icosaèdre. A droite, la représentation de l'organisation des dimères d'enveloppe à la surface du virion. La reconstruction de la section centrale montre des couches concentriques de densité de masse correspondant à l'enveloppe (16).
Lipid bilayer : bicouche lipidique ; Core : noyau ; E and M : E et M.

d. Le génome viral

Le génome du VWN est constitué d'un ARN simple brin de 11 kb coiffé à son extrémité 5' (7-méthylguanosine) et non polyadénylé en 3' (figure 7). Les régions non codantes (NC) 5' et 3' sont conservées. Elles forment des structures secondaires en épingle à cheveux qui interviennent dans la transcription mais aussi dans la traduction et l'emballage de l'ARN viral (33). Le génome est traduit en une polyprotéine de 3400 acides aminés environ. Celle-ci est clivée durant et après la traduction par des protéases cellulaires et virales en 10 protéines virales. Les trois protéines structurales que sont la protéine de capsid (C), la protéine de pré-membrane (prM) et de membrane (M), la protéine d'enveloppe (E) sont en partie N-terminale de la polyprotéine, la partie C-terminale de celle-ci code les sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Il existe une protéine non structurale NS1' qui est une forme plus longue de NS1, elle est souvent détectée lors d'infections par les membres du séro-groupe de l'encéphalite japonaise (18) (figure 7). L'encapsidation de l'ARN viral (par la protéine C), l'interaction et la fusion avec la cellule cible *via* les protéines de surfaces (M et E) (34) nécessitent les protéines structurales. Ces protéines de surfaces (M et E) sont aussi à l'origine de la stimulation de la réponse lymphocytaire B et T (35, 36). La protéine d'enveloppe est la plus immunogène et induit la majorité des anticorps neutralisants (36). Les protéines non structurales interviennent dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte (37-41).

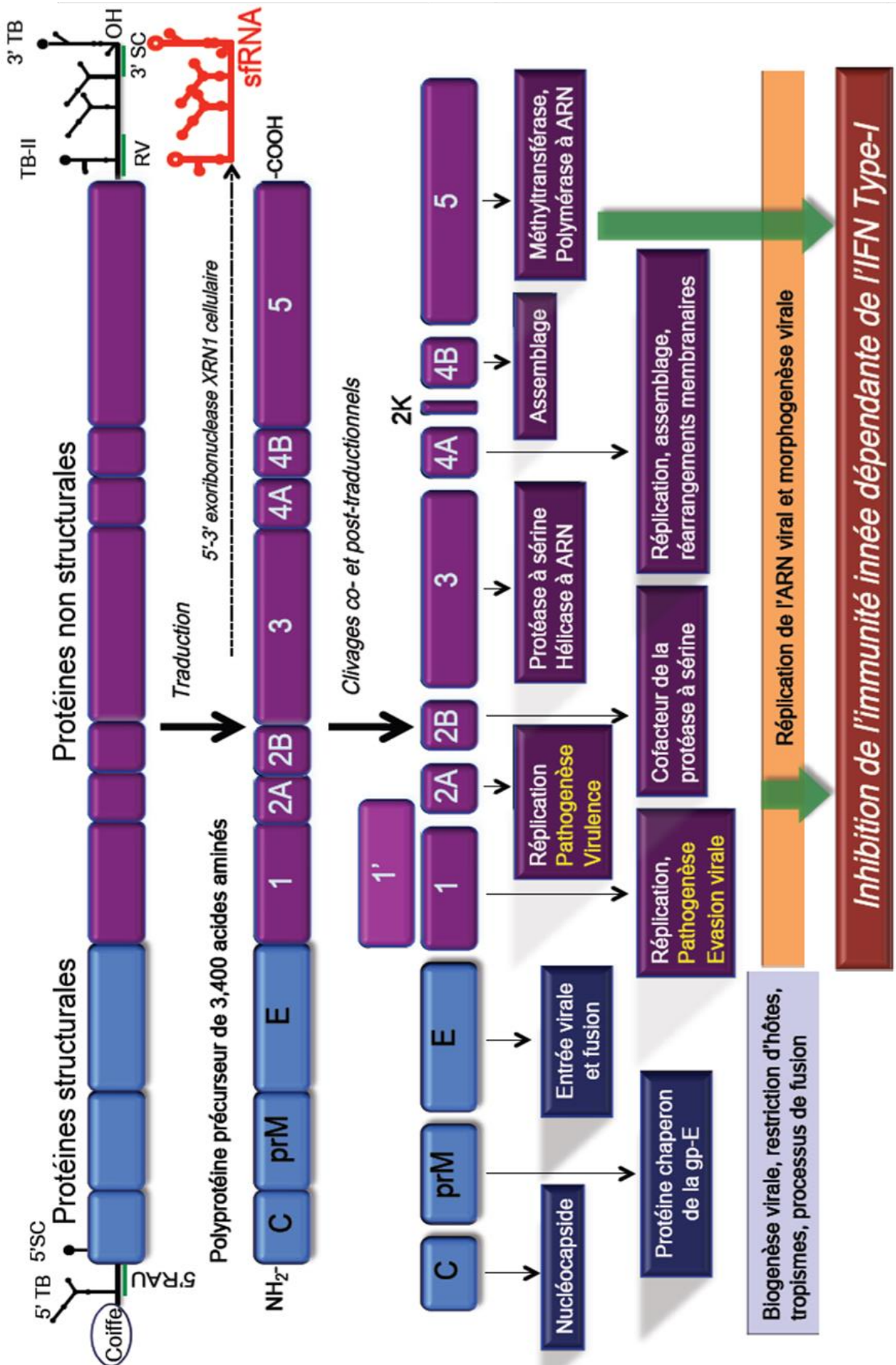


Figure 7: Représentation schématique de l'organisation du génome du VWN et de la traduction des protéines virales avec une indication de leur fonction (d'après Murray *et al.*, 2010 (18)).

e. Les protéines structurales

i. La protéine de capsid

La protéine de capsid (C) fait 11 kDa (42). Les régions N- et C-terminales sont séparés par une région interne hydrophobe impliquée dans la structuration de la capsid (43). Ce domaine est clivé de la protéine de capsid mature par la sérine protéase virale (NS3) (44).

ii. La protéine de membrane

Le précurseur glycoprotéique de 26 kDa (prM) de la protéine de membrane (M) est adressé au réticulum endoplasmique (RE) via le domaine C-terminal hydrophobe de C. La région N-terminale contient 1 à 3 sites de glycosylation, et 6 résidus cystéine conservés qui forment tous des ponts disulfure (42). prM se replie et participe au repliement correct de E (45, 46). L'un des rôles majeur de prM est de permettre le réarrangement pH-dépendant de E lors de son transport dans la voie sécrétoire pendant la libération des nouvelles particules virales. La maturation des particules virales est liée au clivage de prM en pr et M par la furine du Golgi (47). Ce clivage entraîne la séparation des hétérodimères prM-E et la formation des homodimères de E (figure 8). Des mutations modifiant le nombre de résidus cystéine dans le fragment pr entraînent la formation de virions sensibles à la température possédant des prM intacts ce qui provoque une perte significative de virulence liée à un blocage de la maturation des virions (48).

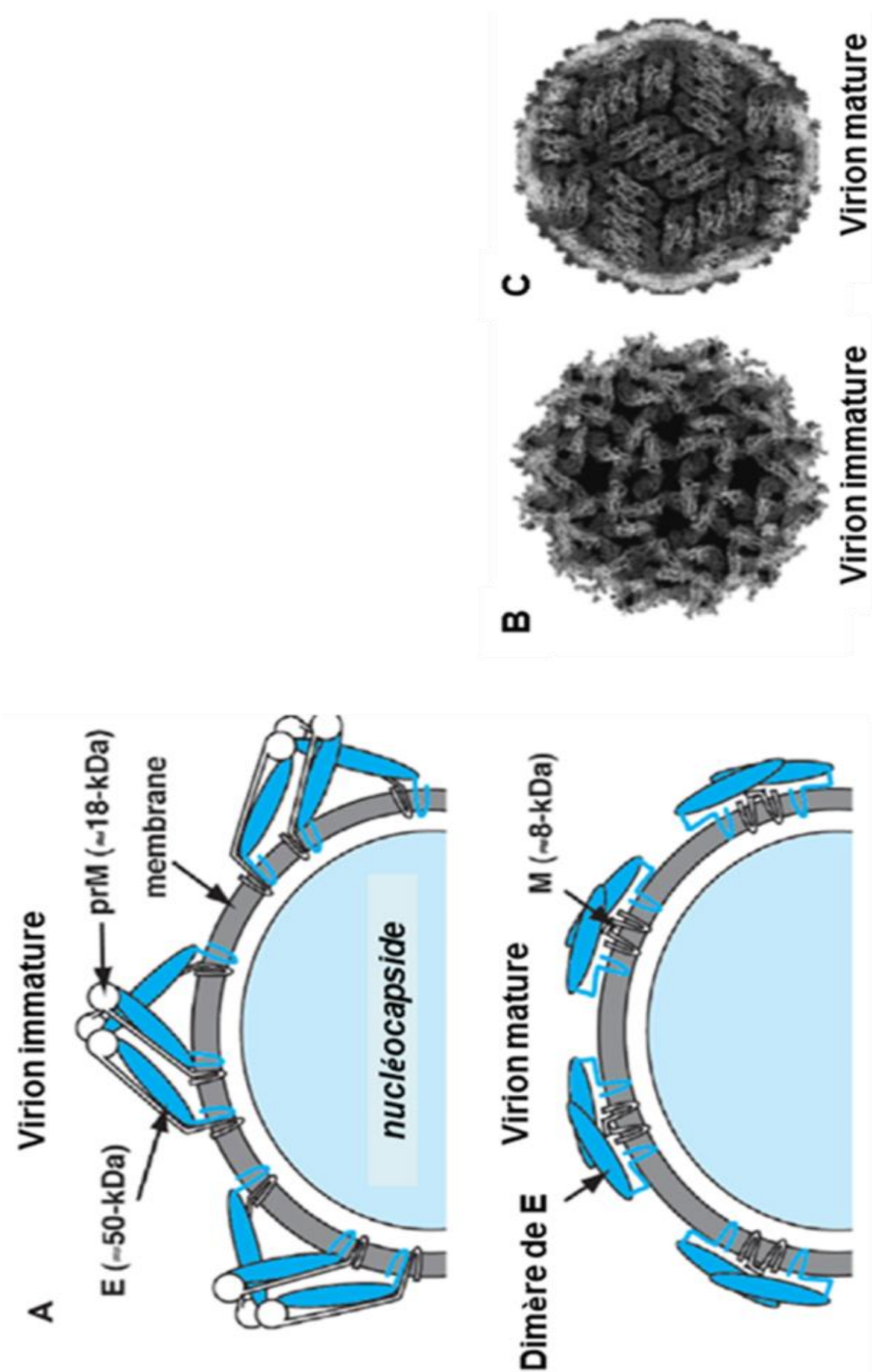


Figure 8: Maturation de la néo-particule virale (d'après Lindenbach *et al.*, 2007 (42)).

A : Dissociation de prM et E suite au clivage de prM en deux fragments, pr et M. Formation des homodimères de E.

B : Virion immature avant clivage de prM

C : Virion mature après clivage de prM

iii. La protéine d'enveloppe

Principale protéine à la surface du VWN, la protéine d'enveloppe (E) de 53 kDa joue un rôle dans la reconnaissance du récepteur chez les mammifères et la fusion à la membrane plasmique. E est constituée de domaines glycosylés (DI, DII, DIII) renfermant une boucle hydrophobe, et le peptide de fusion, qui permet l'entrée virale. Des récepteurs potentiels du VWN ont été identifiés tel que le TLR3 (49), DC-SIGN et DC-SIGNR (50-52). Des récepteurs distincts et agissant selon des modèles différents ont été impliqués dans l'infection des cellules de moustiques et des cellules de mammifères (53, 54). E est constitué de 12 résidus cystéines conservés. La protéine E a un haut degré de glycosylation et cela est un facteur déterminant dans la neuroinvasion du VWN (55). Dans sa conformation native E se replie en une structure allongée, et forme des homodimères disposés tête bêche (42). Les sous-unités de E se comportent alors comme suit : DI et DII se projettent le long de la surface du virion tandis que DIII maintient la conformation de l'ensemble (figure 9). Le domaine III est impliqué dans la liaison au récepteur et représente la cible principale des anticorps neutralisants (56).

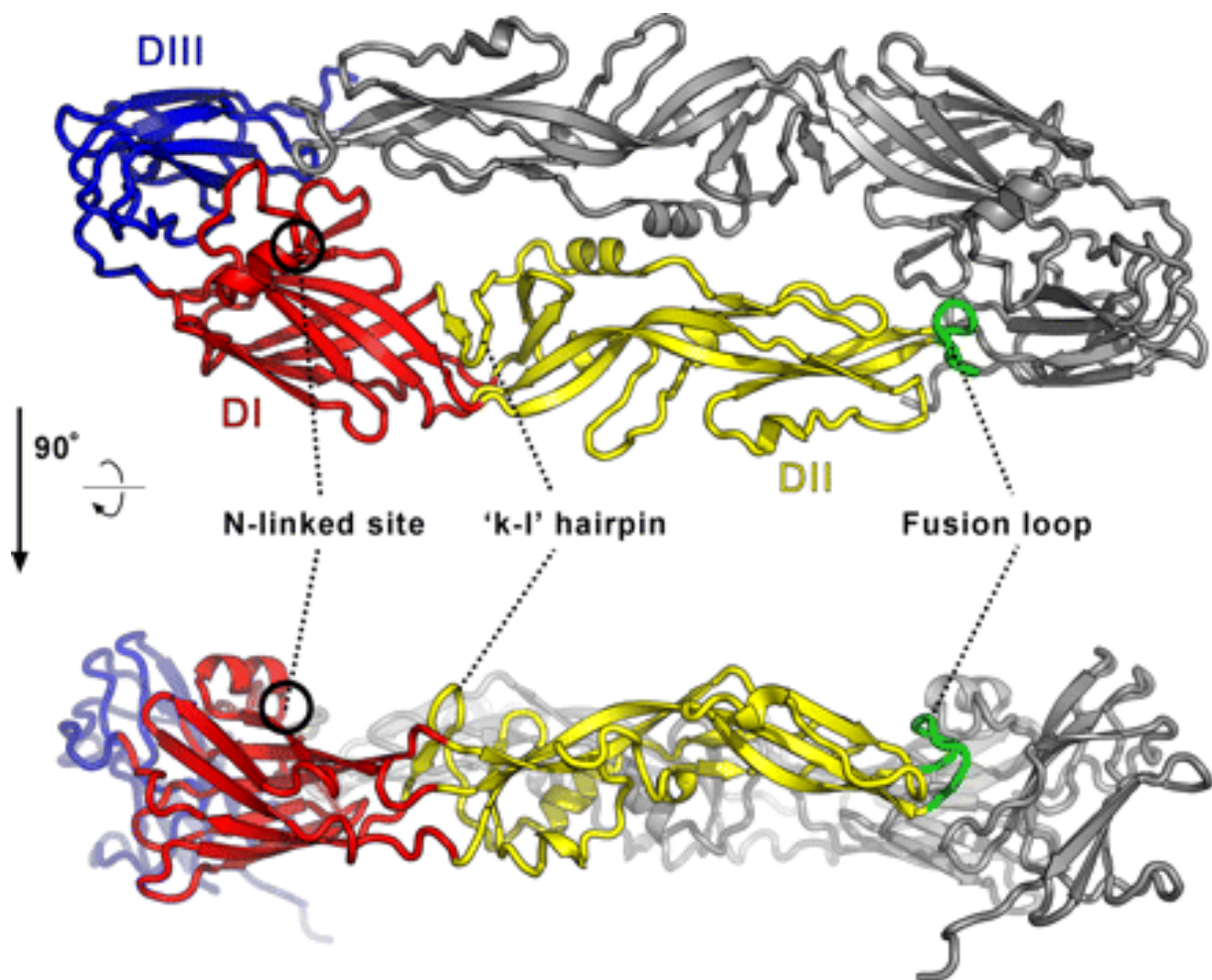


Figure 9: Représentation de la structure de la protéine d'enveloppe (forme homodimérique présente à la surface des particules virales matures) (57).

La figure montre une vue du dessus et de côté de la protéine. La protéine d'enveloppe possède trois domaines dont le domaine II contenant le peptide de fusion. Fusion loop : boucle de fusion, Hairpin : structure en épingle à cheveu

A pH acide (vésicule d'endocytose par exemple), les dimères se dissocient en monomères et s'organisent ensuite en trimères dans lesquels les peptides de fusion du domaine II sont entièrement exposés vers la membrane avec laquelle la particule virale doit fusionner (figure 10). La trimérisation s'opère par une rotation du domaine III et son repliement d'un se traduit par un déplacement de 30 Å par rapport au domaine I et par une rotation du domaine II par rapport au domaine I (42).

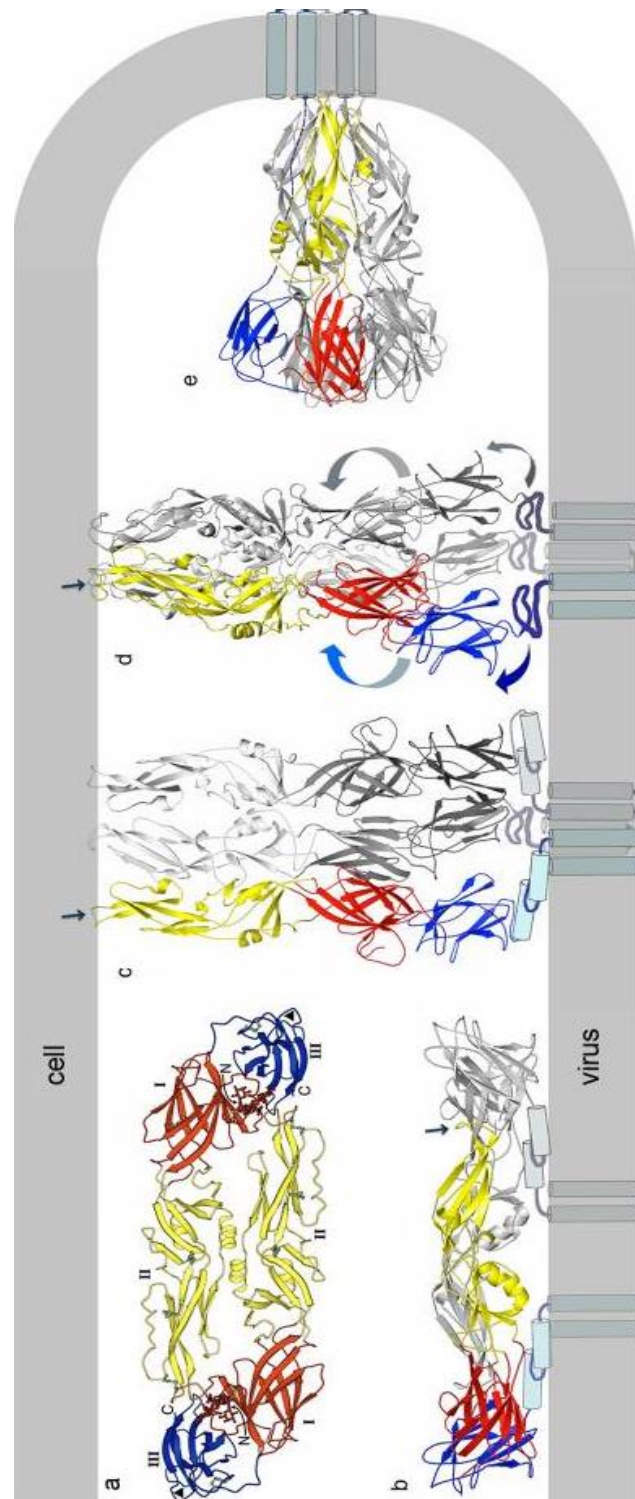


Figure 10: Représentation de la forme trimérique de E (d'après Harrison, 2008 (58)).

La protéine d'enveloppe est représentée lors de l'étape de fusion, lorsque les dimères se dissocient en monomères suite à l'exposition au pH acide de l'endosome et exposent leurs peptides de fusion (designer par une flèche) vers la membrane plasmique de la cellule cible. Cell : cellule.

f. Les protéines non structurales

i. NS1

NS1 est une glycoprotéine de 46 kDa internalisée dans le RE, séparée de E par une signal-peptidase cellulaire au cours de sa synthèse et qui voit une fois dans le RE sa jonction NS1/NS2A clivée par une peptidase cellulaire non définie (59-61). NS1 est majoritairement séquestrée dans les cellules infectées mais elle peut aussi être localisée à la surface cellulaire ou être sécrétée des cellules de mammifère (62).

NS1 a été localisée dans les sites de réplication de l'ARN viral (63-65). Des études suggèrent son implication dans la réplication de l'ARN, et il a été observé que des mutations sur son site de glycosylation entraînaient des défauts dans la réplication de l'ARN viral (66). La fonction de la forme extracellulaire de NS1 n'est pas connue mais elle est particulièrement immunogène (56).

De plus, NS1 est impliquée dans l'inhibition de la réponse innée antivirale :

-via l'inhibition du complément par un mécanisme de recrutement du facteur H qui est un régulateur de la voie alterne du complément dont la forte concentration empêche la formation de la C3 convertase et accélère sa dissociation, ce qui induit aussi une diminution de la réponse inflammatoire associée (67, 68).

-via l'inhibition de la transduction du signal induit par le TLR3. L'expression de NS1 inhibe aussi la production TLR3-dépendante de l'interleukine 6, et donc la mise en place d'un état antiviral (69).

ii. NS2A et NS2B

NS2A est une protéine hydrophobe de 22 kDa dont le clivage NS2A/NS2B est effectué après association de NS3 à NS2B. NS2A est impliquée dans l'assemblage des particules virales (38). Elle est localisée dans les sites de réplication et interagit avec NS3 et NS5, ainsi qu'avec la région 3' non codante (70).

NS2A pourrait assurer la coordination entre l'empaquetage de l'ARN et sa réplication (71). NS2A est aussi impliquée dans l'inhibition de la réponse interféron α/β (72, 73).

NS2B est une protéine de 14 kDa associée aux membranes internes (74). NS2B forme un complexe stable avec la partie sérine protéase de NS3 (75) et agit comme co-facteur de NS3.

lumière du réticulum endoplasmique (79). 2K joue par ailleurs un rôle dans la synthèse de l'ARN viral (86).

Des études ont montré que les clivages NS4A/2K/NS4B étaient nécessaires pour l'induction des réarrangements des membranes internes par NS4A (87). NS4B appartient au complexe de réplication virale (88). NS4B est co-localisée avec NS3 et l'ARN génomique dans des structures membranaires dérivées du RE, lieu de la réplication virale (89). Une mutation dans la partie C-terminale de NS4B réduit la vitesse de réplication et la quantité d'ARN synthétisé, ce qui suggère que cette région de NS4B est importante pour la réplication virale (90). NS4B est également impliquée dans l'échappement à la réponse immunitaire innée de l'hôte vertébré en inhibant la voie interféron α/β (91, 92).

v. **NS5**

NS5 est une protéine de 103 kDa, très conservée. NS5 est l'ARN-polymérase-ARN-dépendante, nécessaire pour la réplication de l'ARN viral au sein de complexes faisant intervenir des protéines d'origine à la fois virale et cellulaire (18). NS5 participe également à la suppression de la réponse innée de l'hôte en empêchant l'accumulation de la forme phosphorylée de STAT1 (pY-STAT1) et en inhibant l'expression des gènes sous contrôle des interférons de type I (93).

g. **Les régions non codantes**

i. **La région 5' non codante**

La région 5' non codante (5' NC) possède une coiffe m⁷GpppA reconnue par la protéine cytoplasmique eIF4B (facteur eucaryotique d'initiation de la traduction) et par le facteur eIF4F du complexe d'initiation (94, 95). Ce complexe recrute la petite sous-unité ribosomale pour la traduction de la polyprotéine virale.

ii. **La région 3' non codante**

La région 3' non codante (3' NC) possède une structure en épingle à cheveux très conservée qui sert de promoteur à la synthèse du brin ARN(-) (96), ainsi qu'une séquence de cyclisation. Cette séquence induit l'interaction entre les parties 5' et 3' NC du génome viral, ce qui est nécessaire pour la réplication (97-100). C'est l'action de la protéine PABP (poly(A) binding protein) qui interagit avec la région 3'NC et eIF4F (101) qui permet la réussite de la cyclisation, le génome du VWN n'étant pas polyadénylé (cf. II.d).

La structure en épingle à cheveux se lie à de nombreuses protéines cellulaires, permettant d'initier la synthèse du brin d'ARN(-) (96, 98, 102-104).