

Le cycle viral

a. Entrée virale

L'entrée virale débute par l'endocytose du VVN suite à l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs. L'abaissement du pH dans l'endosome entraîne la fusion entre l'enveloppe et la membrane endosomale libérant ainsi la capsid dans le cytoplasme (figure 12).

L'exposition à un pH acide entraîne un changement de conformation de la protéine E, notamment sa trimérisation et un réarrangement de sa surface exposant le peptide de fusion vers la membrane cible (II, protéine structurale, protéine d'enveloppe ; figure 10) (51, 105). Ce peptide s'insère alors dans les membranes cellulaires et se replie en épingle à cheveux permettant de rapprocher les deux membranes, ce qui entraîne la formation d'un pore permettant le passage de la capsid.

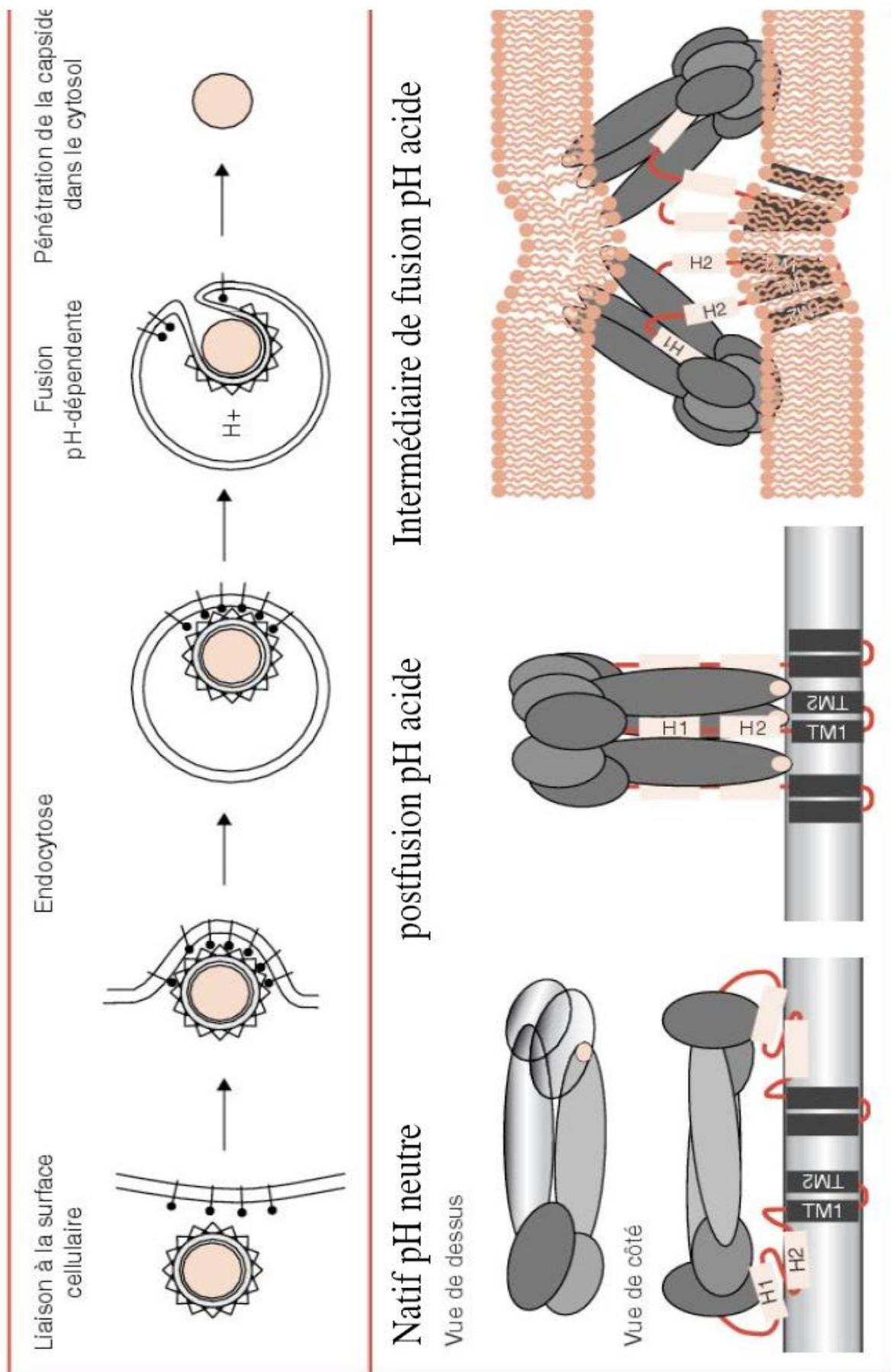


Figure 12: Mécanisme de fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire par endocytose (d'après Cosset, 2010 (106)).

La protéine d'enveloppe se lie à son récepteur à la surface de la cellule cible, la particule virale est ensuite endocytée. Lors de l'acidification de l'endosome, la protéine E change de conformation, exposant ainsi le peptide de fusion. La capside est alors libérée dans le cytoplasme.

b. Cycle cytoplasmique : Libération de l'ARN génomique et traduction de la polyprotéine

L'ARN(+) génomique est coiffé en 5' mais ne possède pas de queue polyA en 3'. La région 3' NC possède une structure en épingle à cheveux très conservée. L'ARN(+) peut être directement traduit en protéine par la machinerie cellulaire comme les ARN messagers cellulaires. Les clivages protéiques sont co-translationnels et se font grâce à des protéases virales et cellulaires (figure 13). Les protéines d'enveloppe doivent être glycosylées. Pour cela, elles doivent transiter dans le RE et le Golgi. En cours de synthèse, des signaux d'adressage envoient les régions prM, E et NS1 de la polyprotéine dans le RE (figure 13). Les séquences signal sont ensuite clivées par des signalases cellulaires. Les protéines prM et E restent ancrées dans la membrane, la protéine NS1 est libérée dans la lumière du RE et sera excrétée. La protéine prM est clivée plus tard dans le trans-Golgi par les furines du Golgi (42).

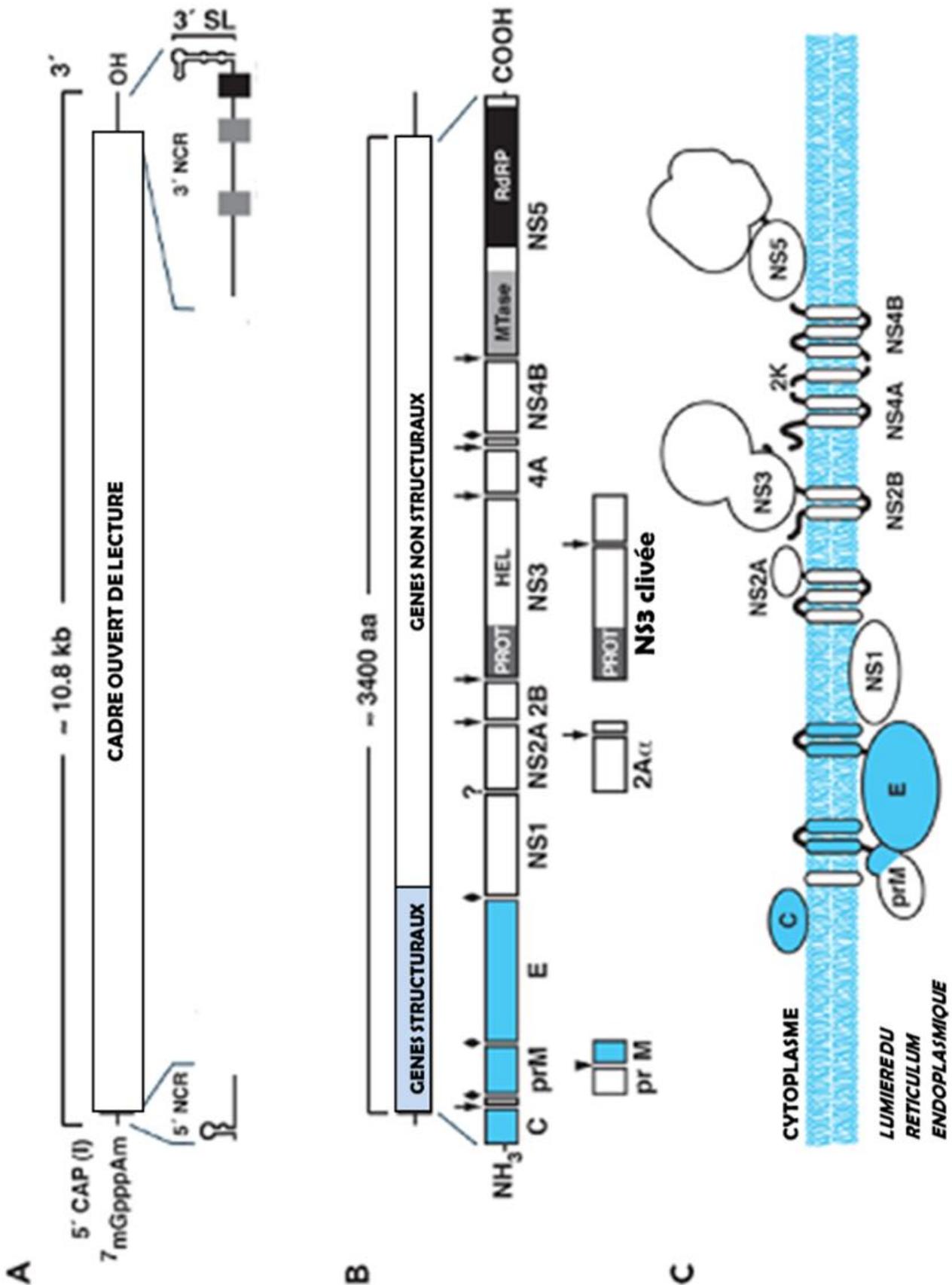


Figure 13 : Structure du génome viral et expression de la polyprotéine (d'après Lindenbach *et al.*, 2007 (42))
A : structure du génome (protéines structurales et non structurales) et des éléments ARN (coiffe, régions 5' et 3' NC).
B : Traitement de la polyprotéine par les protéases cellulaires \blacklozenge , virale (\downarrow), furines (\blacktriangledown) ou inconnues (?).
C : topologie des produits de clivage de la polyprotéine. NCR (Non Coding Region) : région non codante, 3'SL (Stem Loop) : structure secondaire en épingle à cheveux.

i. Réplication

La réplication s'effectue dans le cytoplasme, en étroite liaison avec le RE au sein des complexes de réplication virale (RC) constitués de NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B et NS5 (figure 14).

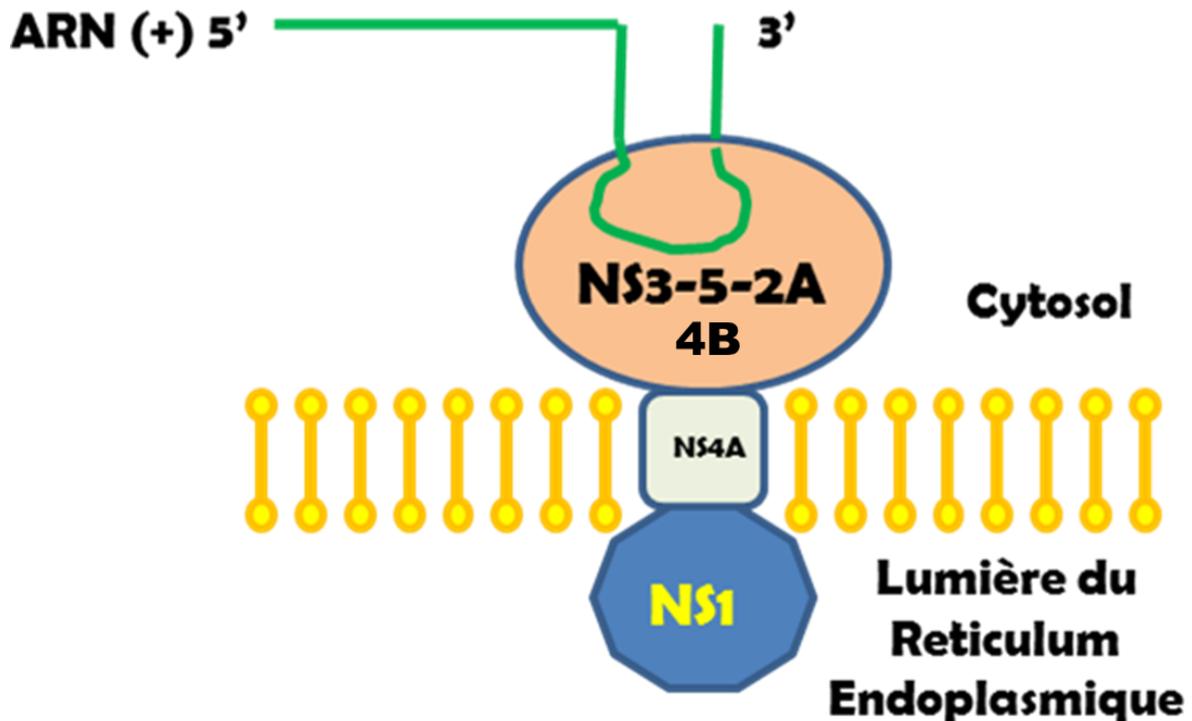
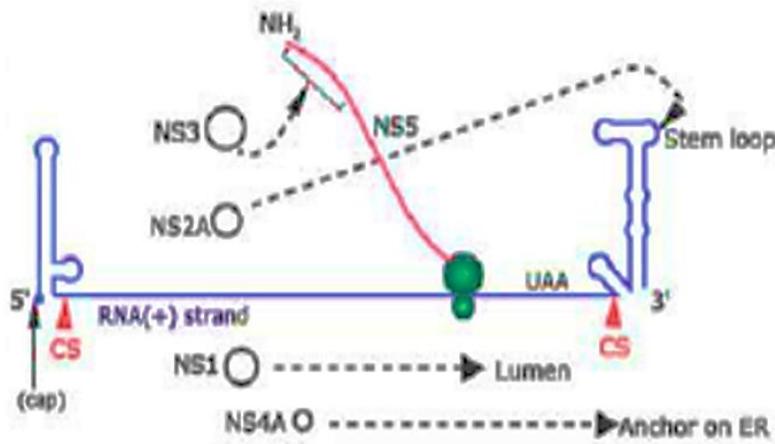


Figure 14: Le complexe de réplication virale (RC) constitué de NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B et NS5.

La réplication débute par la synthèse d'un brin d'ARN de polarité négative (ARN-) qui sert de base pour la synthèse d'un ARN génomique positif sous un mode semi-conservatif et asymétrique. La réplication est couplée à la traduction et à l'assemblage (figure 15). Le complexe de réplication s'assemble avec les protéines néo traduites. La réplication est couplée à l'encapsidation.

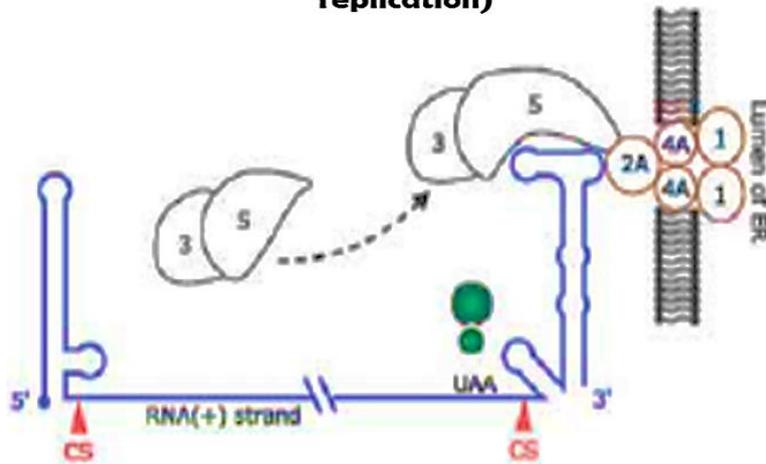
1

Traduction de l'ARN(+)



2

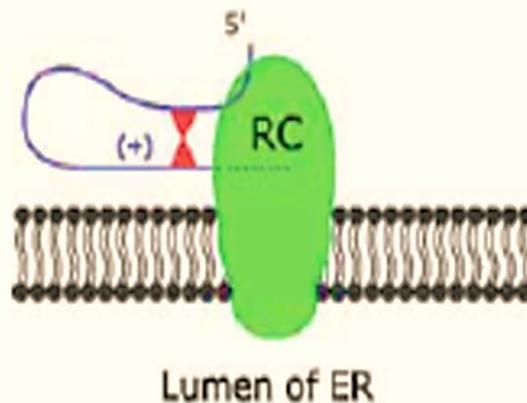
Traduction de NS5 terminée (17 min) et début de l'assemblage du RC (complexe de réplication)



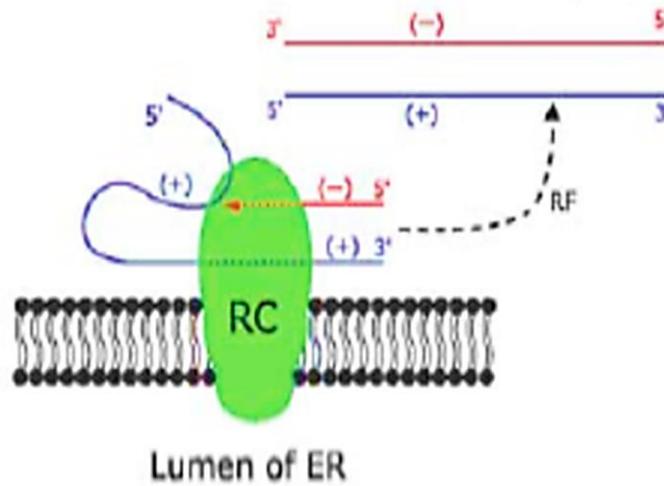
(1) Stem loop : structure secondaire en épingle à cheveux ;
 RNA (+) strand : brin d'ARN (+) ; Lumen : lumière
 Anchor on ER : ancrage sur le RE ; Lumen of ER : lumière du RE

3

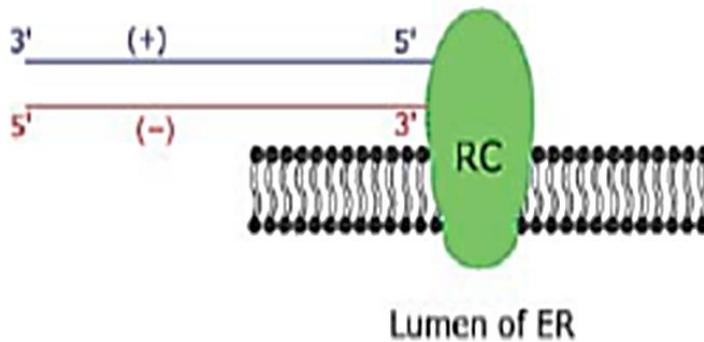
Circularisation du brin d'ARN (+) et fin de l'assemblage du complexe de réplication



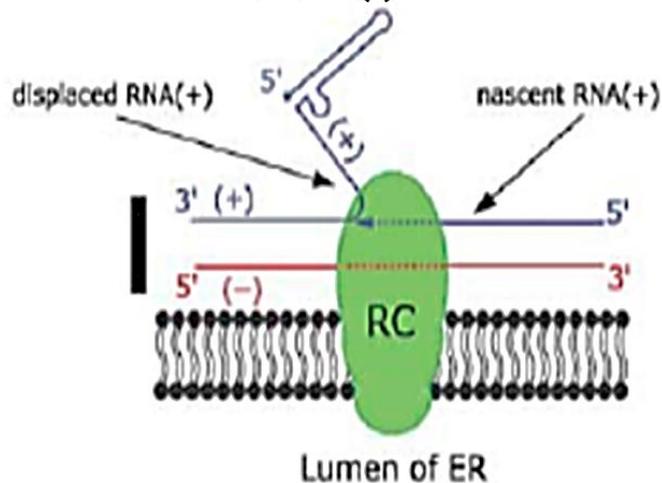
4 Le complexe de réplication transcrit l'ARN(+) en ARN(-) aboutissant à la forme répliquative (FR)



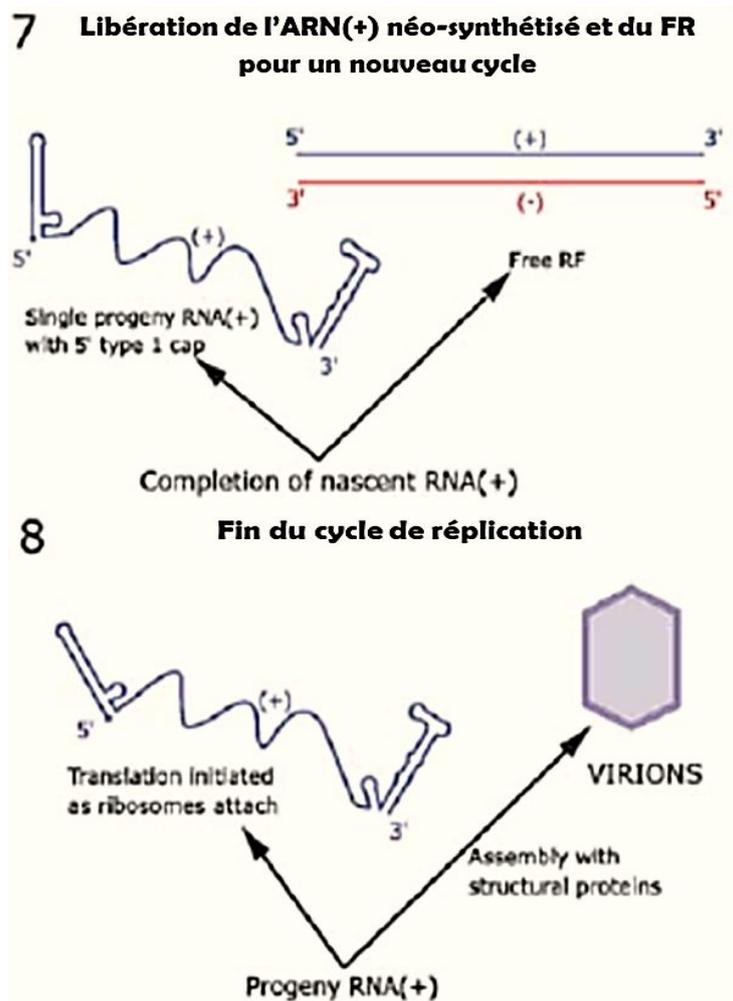
5 Le FR se réattache au complexe de réplication pour l'initiation de la synthèse de l'intermédiaire de réplication (IR)



6 Réplication semi-conservative asymétrique de l'ARN (+)



**(6) displaced RNA(+): ARN (+) déplacé
nascent RNA (+): ARN (+) naissant
FR: Forme répliquative**



(7) Single progeny RNA(+) with 5'type 1 cap : copie unique d'ARN (+) coiffé
Completion of nascent RNA (+) : maturation de l'ARN (+)
FR : Forme répllicative
Free RF : FR libre

(8) Translation Initiated as ribosomes attach : initiation de la traduction lorsque les ribosomes s'attachent
Progeny RNA (+) : ARN(+) néo-synthétisé
Assembly with structural proteins : Assemblage avec les protéines structurales

Figure 15: Couplage de la traduction, de la réplication et de l'assemblage des particules virales (d'après Westaway et al., 2003 (107))

La traduction de l'ARN (+) est suivie par la formation des complexes de réplication où l'ARN(+) est transcrit en ARN (-). Le brin d'ARN (-) sert de matrice pour la néo-synthèse de brins d'ARN (+). L'ARN (+) néoformé va alors être traduit et de nouvelles particules virales vont pouvoir se former.

ii. L'assemblage des particules virales

L'assemblage des particules virales consiste en l'association de l'ARN avec les protéines de capsid. L'acquisition de l'enveloppe s'opère lors du bourgeonnement au niveau du RE.

La protéine prM maintient la conformation de E pour éviter l'exposition du peptide de fusion. Post-bourgeonnement, il y a formation de particules virales immatures présentant un aspect hérissé correspondant aux hétérodimères prM-E présents dans l'enveloppe virale. Le clivage de prM en M se déroule dans l'appareil de Golgi permettant la maturation de la particule virale (voir II,e,ii) (108).

iii. Résumé

Le VWN se lie à sa cellule cible via le domaine de liaison au récepteur de la protéine d'enveloppe (figure 16). La particule virale est endocytée. Le pH acide de l'endosome provoque un changement de conformation de la protéine d'enveloppe, qui permet l'exposition du peptide de fusion. Ensuite la capsid est libérée dans le cytoplasme, qui va libérer l'ARN viral qu'elle contient. L'ARN de polarité positive (ARN+) est immédiatement traduit. Les protéines virales issues de la traduction s'assemblent pour former un complexe de réplication. Les ARN néo-synthétisés sont encapsidés et les néo-virions transportés via la voie d'exocytose. De nouveaux virions sont libérés.

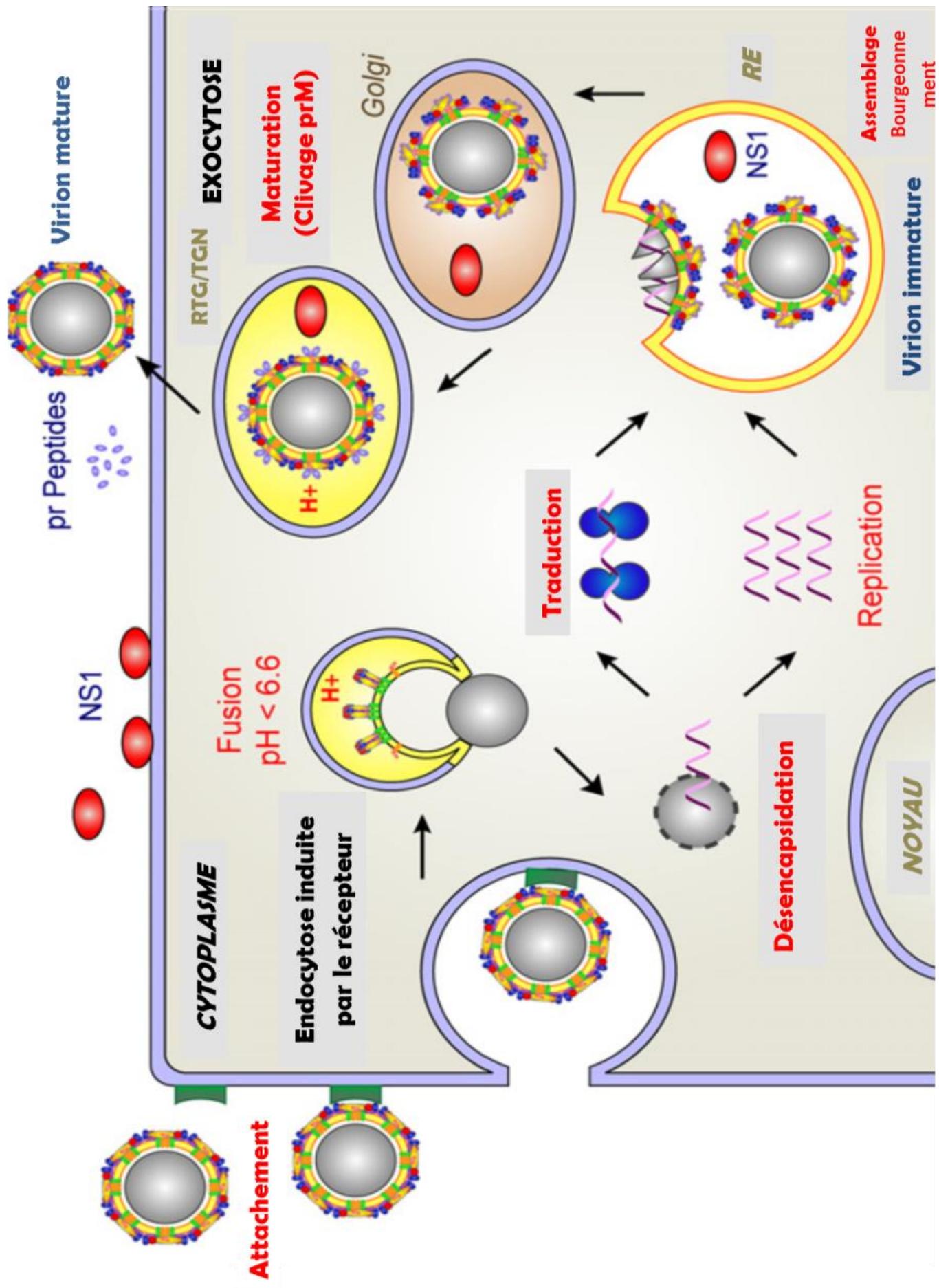


Figure 16: Représentation schématique du cycle de multiplication virale du VWN (d'après Heinz et Stiasny, 2011 (109)).

IV. Cycle de transmission du virus

Des études réalisées en Egypte ont permis de préciser le cycle de transmission du VWN (33, 110) au cours des années 50, identifiant le rôle des oiseaux comme hôtes réservoirs, et celui de certains moustiques comme vecteurs (figure 16). Ces études ont permis à l'époque de définir des zones de circulation endémique du virus et des zones de transition où le virus ne s'installe pas, ce qui comme précédemment évoqué n'est plus tout à fait le cas aujourd'hui.

Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin (figure 16). Après passage de la barrière intestinale, le virus se réplique localement puis atteint les glandes salivaires pour ensuite être transmis lors d'un repas sanguin ultérieur. La dissémination est directement liée aux conditions climatiques (température, hygrométrie...), qui sont déterminantes pour l'activité des vecteurs et la transmission du virus. De nombreuses espèces de moustiques, de genres différents (*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*...) ont été trouvées porteuses du VWN (111).

Des études expérimentales ont permis d'identifier certaines espèces impliquées dans le cycle de transmission du virus (112) tel que les *Culex pipiens* et *Culex modestus*. Présents dans les zones urbaines ou dans les zones humides, ils semblent particulièrement impliqués dans la transmission du virus en Europe.

L'intensité de la virémie varie selon les espèces d'oiseaux mais sa durée reste assez courte (de l'ordre de quelques jours), certaines développent une virémie généralement suffisante pour infecter la plupart des moustiques alors que d'autres développent une virémie faible (113, 114).

La virulence d'un isolat nord-américain a été évaluée sur 25 espèces aviaires américaines. Les passériformes (passereaux), et particulièrement les corvidés ont été identifiés comme très sensibles à l'infection, avec de forts taux de mortalité et ont permis une amplification efficace du virus : le corbeau américain (AMCR, pour AMERICAN CROW) et le geai bleu (*Cyanocitta cristata*), ont présenté une forte virémie comprise entre 8 et 10 log₁₀ PFU/mL (Plaque Forming Unit/mL) (114). Des infections expérimentales réalisées sur de jeunes oies avec un isolat nord-américain ont permis d'observer des taux de mortalité similaires à ceux observés dans la nature avec des virémies suffisantes pour infecter les moustiques (115). Aux Etats-Unis, de nombreuses espèces d'oiseaux ont été sévèrement touchées par l'épidémie/épizootie à VWN, et les effectifs de ces espèces ont diminué après 1999 (111, 116). Paradoxalement la baisse d'une population aviaire peut tendre à augmenter la transmission du VWN au lieu de la diminuer.

Différents types de rapaces (117) ont été plus récemment trouvés comme sensibles à l'infection à VWN en Europe (118-120). Des infections expérimentales sur des espèces aviaires européennes, ont permis de montrer que la perdrix rouge (*Alectoris rufa*) de l'ordre des galliformes est susceptible à une infection par des souches de lignage 1a identifiées à l'Ouest du

bassin méditerranéen (souches Maroc 2003 (Ma03) et Espagne 2007 (SP07)) (121). Le moineau domestique (*Passer domesticus*) est un bon réservoir pour des souches européennes de lignage 1 et 2 isolées en 2007-2009 (122, 123). Le pigeon (*Columbia livia*) et la corneille (*Corvus corone*) sont des hôtes réservoirs pour les souches de lignage 1 du VWN, avec une sensibilité à l'infection virale plus marquée pour la corneille (au minimum, 33% de létalité observée avec une souche de lignage 1 peu virulente, France 2000) (124-126). De plus, un modèle expérimental d'infection aviaire a été développé chez le poulet de 1 jour (*Gallus gallus domesticus*)(124).

Espèce oiseau	Souche	Lignage	Voie d'administration	Dose	Mortalité	Virémie
Oie d'Emden (<i>Anser anser domesticus</i>)	WN 9/99 (NY)	1	Sous cutané	10 ^{3,3} TCID ₅₀	75%	10 ⁴⁻⁶ TCID ₅₀
Oie d'Emden (<i>Anser anser domesticus</i>)	Hun03	1	Infection naturelle	NA	NA	NA
Épervier d'Europe (<i>Accipiter nisus</i>)	Hun04 and Hun05	2	Infection naturelle	NA	NA	NA
Autour des palombes (<i>Accipiter gentilis</i>)	Hun04 and Hun05	2	Infection naturelle	NA	NA	NA
Aigle ibérique (<i>Aquila adalberti</i>)	Sp07	1	Infection naturelle	NA	NA	NA
Perdrix rouge (<i>Alectoris rufa</i>)	Mar03 / Sp07	1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	70% / 30%	10 ^{7.2} PFU/mL / 10 ^{6.9} PFU/mL
Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>)	It08 / It09 / Sp07 / NY99	1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	15% - 25%	10 ⁵ PFU/mL à 10 ⁹ PFU/mL
Moineau domestique (<i>Passer domesticus</i>)	Aut08 / NY99	2 / 1	Sous cutané	10 ⁴ PFU	0%	10 ^{6,72} / 10 ^{9,62}
Pigeon biset (<i>Columba livia</i>)	It09/11/12	1	Sous cutané	10 ⁶ TCID ₅₀	0%	10 ^{1,99} - 10 ^{5,39} TCID ₅₀ /mL
Corneille noire (<i>Corvus corone</i>)	Is98 / Fr2000	1	Sous cutané	10 ^{3,5} TCID ₅₀	100% / 33%	10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
Faucon gerfaut (<i>Falco rusticolus</i>)	NY99/ Aut08	1 / 2	Sous cutané	(LD) 500 TCID ₅₀ , (MD) 10 ⁴ TCID ₅₀ , (HD) 10 ⁶ TCID ₅₀	NY99:HD 100% NY99:MD,LD 0% Aut08:LD100% Aut08:MD50% Aut08:HD0%	10 ^{2,5} - 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL

Tableau 1 : Tableau non exhaustif des travaux effectués sur des oiseaux présents en Europe et infectés par le virus West Nile (115, 117-119, 121-123, 125-127). NA = non applicable

Les oiseaux migrateurs sont considérés comme de bons agents disséminateurs du VWN car ils peuvent migrer sur de grandes distances (128). Ce sont sans doute les oiseaux qui sont à

l'origine de l'introduction du VWN à partir de l'Afrique sub-saharienne vers l'Europe et la région méditerranéenne (129-131). Depuis la découverte du virus en 1937, aucune mortalité aviaire naturelle n'avait été rapportée (132), jusqu'aux foyers de la fin des années 1990 en Israël et aux Etats-Unis (115, 133, 134). En 1998, le VWN est isolé à partir d'une cigogne moribonde trouvée en Israël (135). Des mortalités élevées chez les jeunes oiseaux de 3 à 8 semaines étaient observées dans des populations de cigognes et d'oies (136).

Des cas de transmission directe par voie alimentaire (prédation de petits oiseaux ou rongeurs infectés par le VWN) ou par contacts directs entre oiseaux ont été décrits (137). Une transmission directe pourrait jouer un rôle épidémiologique non négligeable dans le contexte nord-américain (infection de corbeaux) ou en Hongrie (infection de rapaces par des virus de lignage 2) (138). L'apparition de cas chez l'homme et le cheval est liée à une circulation importante du virus dans l'avifaune, via des vecteurs ornithophiles, et à la présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles, capables de s'infecter à partir d'oiseaux virémiques et de piquer ultérieurement un hôte sensible (figure 17) (18). De très nombreuses espèces animales peuvent être infectées dont des reptiles, des amphibiens, des mammifères....

Le VWN provoque des signes cliniques essentiellement chez l'homme et le cheval. Les signes cliniques objectivés consistent en des atteintes pseudo-grippales avec fièvre, céphalées, douleurs musculaires et articulaires. Il y a aussi plus rarement, des atteintes neuroméningées, pouvant être mortelles, associées ou non à une encéphalite. Des cas de paralysies flasques aiguës semblables à celles rencontrées dans la poliomyélite ou des cas évoquant un syndrome de Guillain-Barré, ont été rapportés aux Etats-Unis chez l'homme (139). Contrairement aux oiseaux, ces espèces ne développent généralement pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguin.

Chez le cheval, le niveau de virémie est au maximum de 10^3 particules virales/mL (140). Pour infecter un moustique *Culex*, il faut une dose minimale d'environ 10^5 PFU/mL (114). L'homme et le cheval sont ainsi considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques (141) (figure 17). Par contre, d'autres mammifères ainsi que des reptiles peuvent contribuer à la persistance du virus dans un environnement donné par la virémie soutenue qu'ils développent (142).

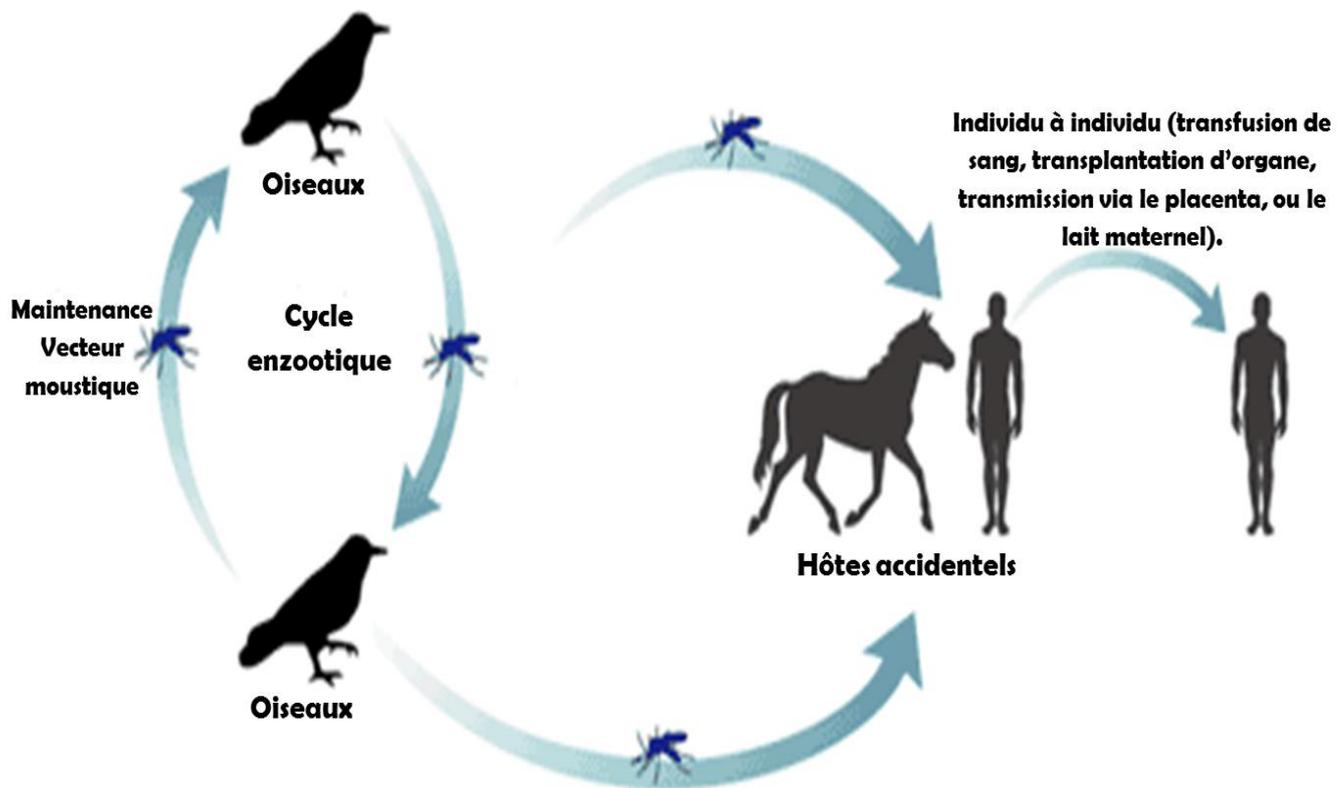


Figure 17: Cycle de transmission du virus West Nile (d'après Huhn *et al.*, 2003 (143)).

Les oiseaux sont les hôtes réservoirs du virus. Les moustiques s'infectent lors d'un repas sanguin. La présence de moustiques vecteurs, à la fois ornithophiles et mammophiles, est responsable de la transmission du virus à des mammifères sensibles dont l'homme et le cheval. Ces hôtes ne développent pas une virémie suffisante pour permettre la transmission du virus à des vecteurs compétents, lors d'un repas sanguin et sont des culs de sac épidémiologiques. En revanche, des cas de transmission directe suite à une transfusion sanguine, des greffes d'organes, par voie transplacentaire ou par le lait maternel ont été rapportés.

Les mécanismes de la persistance du virus lors de la période d'inactivité des vecteurs restent peu investigués. La transmission transovarienne du virus à la descendance est décrite pour certains flavivirus, comme ceux de la dengue ou de la fièvre jaune, chez des vecteurs du genre *Aedes*. Elle existe pour certaines espèces de *Culex* avec des taux bien moindres, et les moustiques *Culex* sont considérés comme des vecteurs peu efficaces en terme de transmission verticale pour le VWN (144). Malgré tout le phénomène de persistance hivernale du VWN chez les moustiques est décrit dans les conditions naturelles (145). L'hiver rigoureux dans les zones infectées américaines en 1999 n'a pas enrayé l'épidémie, le virus a persisté et a gagné peu à peu l'ensemble du territoire en 3-4 ans. Durant l'hiver 1999-2000, des vecteurs adultes en hibernation ont été trouvés infectés. Le rôle des tiques dans la persistance du virus a aussi été évoqué, la transmission ayant été démontrée expérimentalement chez certaines espèces de tiques (146). Des études ont montré que des phénomènes de persistance de l'infection virale chez les arthropodes seraient liés à des mécanismes d'ARN interférence mis en place chez le vecteur et modulés par les flavivirus (147-149). Alors que la virémie chez les oiseaux s'avère être relativement courte (de l'ordre d'une semaine), le virus West Nile a pourtant été isolé sur des

rapaces en hiver. Ce qui laisserait supposer un état latent du virus associé possiblement à des phénomènes de réactivation (150).

Le développement de modèles animaux d'infection par le VWN a permis de mieux comprendre la pathogénie du VWN *in vivo*. L'apparition des modèles murins avec leurs qualités propres (coût, entretien, reproduction et fond génétique connu et plus aisé à manipuler) a permis d'explorer plusieurs hypothèses biologiques *in vivo* et d'obtenir des modèles pertinents d'infection au VWN. Nous savons ainsi comme décrit plus haut que les espèces aviaires n'ont pas toute la même sensibilité au VWN et que la réponse immunitaire est cruciale dans le contrôle de la pathogénèse virale. Par exemple certains auteurs comme Diamond *et al.*, (2003) (151, 152), ont montré que la réponse humorale est importante dans le contrôle des premières phases de l'infection virale ainsi que pour assurer la survie à l'infection chez l'hôte mammifère. D'autres équipes (153) ont corroboré ces résultats en montrant que la réponse humorale anti-VWN est de longue durée et protectrice chez le moineau domestique (*Passer domesticus*), espèce résistante à l'infection à VWN ou encore certains ont montré l'importance de l'âge dans la sensibilité à l'infection, liée à l'immaturité du système immunitaire à l'éclosion du poussin. Ainsi, la très faible réponse immunitaire observée chez le poulet de moins de 2 semaines est due à l'immaturité de la réponse lymphocytaire T (154) ce qui en fait un modèle pertinent pour les essais d'infections, et Dridi *et al.*, 2013 (124) ont montré qu'il était possible d'utiliser ce modèle de façon plus fine pour étudier la virulence dans l'avifaune des différentes souches de VWN en évaluant les paramètres cliniques et virologiques de l'infection sur des poussins de un jour.

Ces modèles dans leur ensemble ont ainsi permis de mieux comprendre les mécanismes d'infection.

V. Pathogénie chez les hôtes vertébrés

L'infection débute par une piqûre de moustique. Suite à l'injection du virus au niveau de la peau, celui-ci circule dans le sang. De là, deux schémas sont possibles:

- **Une multiplication périphérique, à l'origine d'une phase virémique courte pouvant aboutir à l'infection du système nerveux central.**

Des cellules des tissus cutanés tels que les cellules de Langerhans ou des cellules dendritiques pourraient être le point de départ de la réplication du VWN après l'inoculation par le moustique. Dans l'épiderme, les cellules de Langerhans infectées deviennent des cellules fonctionnelles présentatrices d'antigène (CPA) (155). Elles migrent aux nœuds lymphatiques dans les 24 à 48h post-inoculation, induisant l'expression de cytokines antivirales, de chémokines, l'activation du complément, l'expansion leucocytaire, la préparation de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T (156). Cette migration des CPA infectées entraîne une virémie et l'infection des tissus périphériques.

Ce scénario a pu être validé grâce à des modèles rongeurs. A six jours post-infection, le virus n'est plus décelé dans le sérum ni les organes périphériques, et peut entrer dans le SNC, provoquant des troubles neurologiques (157).

- **Le virus arrive au SNC via les motoneurones.**

Le VWN est transporté à la fois de façon antérograde et rétrograde dans des neurones en culture (158).

En laboratoire il a été montré qu'en infectant directement le nerf sciatique de hamsters *in vivo* le VWN infecte plus particulièrement les motoneurones plutôt que les neurones sensoriels (158). L'infection des motoneurones de la moelle épinière chez le hamster entraîne des faiblesses musculaires et des paralysies flasques (158).

Chez l'Homme, des données cliniques obtenues sur des patients atteints de paralysie ont permis de montrer la présence de lésions dans la corne antérieure de la moelle épinière (16). A ce jour, aucune démonstration n'a été faite de l'entrée du VWN dans le cerveau par cette voie.

VI. La génétique inverse

La biologie moléculaire permet de modifier le génome du VWN pour étudier le rôle des différentes protéines virales. Cela repose sur l'utilisation de « clones infectieux » ou « outils de génétique inverse » qui sont des outils facilitant l'appréhension des différentes fonctions des protéines et structures génomiques du VWN. Ceci permet de créer des clones dans lesquels sont insérés des mutations, des délétions ou encore des chimères entre différentes souches pour étudier l'intérêt fonctionnel de certaines mutations (tableau 2).

Mutation/Chimère	Gène	Clone Infectieux	Conclusion	Modèle	Auteur
Mutations/délétions multiples	Région 3' non codante, sur les boucles	B956	Altération de l'interaction de la région 3'NC avec les protéines cellulaires TIA-1 et TIAR, affectant la réplication de l'ARN viral	Culture cellulaire	Emara et al., 2008 (159)
Délétions	C, délétion de fragments plus ou moins longs dans sa région hydrophobe	NY99	Région hydrophobe indispensable à l'assemblage des virions	Culture cellulaire	Schlick et al., 2009 (160)
Mutation	E _{N154S}	NY99	Perte de la glycosylation. Altération de la neuroinvasion	Souris	Beasley et al., 2005 (55)
Mutations	E	NY99	Rôle de certains résidus (notamment Y329) dans la formation d'une boucle nécessaire pour la viabilité du virus et le repliement du domaine III, et donc influence sur l'antigénicité de E. Importance des résidus G331 et D333 dans l'infectivité du virus	Culture cellulaire et souris	Zhang et al., 2010 (161)
Mutation	NS2A _{A30P}	Kunjin	Induit une augmentation de la réponse IFN Atténuation de la neuro-invasion et de la neuro-virulence	Cellules BHK Souris	Liu et al., 2006 (73)
Mutations	NS2A _{R175K} et NS3 _{T518H}	Kunjin	Identification d'acides aminés clés dans le rôle de NS2A dans l'assemblage des particules virales et de NS3 dans la réplication de l'ARN	Culture cellulaire	Liu et al., 2003 (38)
Mutation	NS3 _{T249P}	NY99 et Kenya (KN-3829)	Atténuation de la virulence du virus NY99 et augmentation de la virulence du virus KN-3829	AMCR (Corbeaux Américains)	Brault et al., 2007 (85)
Mutation	NS5 _{S653F}	Kunjin	Antagonisme de la voie de signalisation JAK/STAT de l'interféron	Culture cellulaire	Laurent-Rolle et al., 2010 (93)
Mutations	Régions 5' et 3' non codante, nucléotides impliqués dans la cyclisation	B956	Diminution de l'efficacité de la réplication	Culture cellulaire	Basu et Brinton, 2011 (162)
Chimères	prM et E	Echanges de gènes NY99/ souches Mexico (TM171-03-ppp1)	Augmentation de la virulence de la souche mexicaine	AMCR, moineaux et roselin du Mexique	Langevin et al., 2011 (163)

Tableau 2: Tableau non exhaustif de travaux effectués sur des clones infectieux du virus West Nile.

Projet

La virulence des souches européennes du VWN, qu'elles proviennent des foyers récents ou plus anciens, est encore mal caractérisée (164). Des différences de virulence dans les souches circulantes du VWN ont été suggérées et pourraient expliquer des situations épidémiologiques et cliniques contrastées entre l'Europe et le continent nord-américain. Des travaux récents semblent indiquer que des souches européennes de lignage 1 du VWN seraient moins pathogènes pour l'hôte aviaire (124, 125) mais aussi virulentes que la souche nord-américaine chez un hôte mammifère modèle, la souris (165, 166). Malgré les schémas épidémiologiques bien décrits du VWN en Amérique du Nord, la base de l'émergence de la pathologie aviaire associée est encore imparfaitement caractérisée. Il a été montré précédemment que la présence d'une substitution d'acide aminé T249P (Thréonine en position 249 remplacée par une Proline) dans l'hélicase NS3, identifiée chez les isolats nord-américains (lignage 1), augmenterait la virulence chez l'oiseau (85). Cette mutation a également été observée dans les souches récemment apparues en Europe aussi bien de lignage 1 que 2, en particulier en Europe de l'Est, mais aussi en Italie (lignage 1) en 2008 (167) et en Grèce (lignage 2) en 2010 (31). De plus, des analyses comparatives de séquences de génomes complets de VWN ont démontré que le même site (NS3-249) était sujet à une évolution adaptative (168). Ces résultats phénotypiques et évolutifs fournissent des preuves convaincantes de la sélection positive d'une mutation codant pour un potentiel de virémie et de virulence accrue chez certaines espèces d'oiseaux. Cependant, différentes études remettent en question le rôle central de la mutation NS3 249 (169)

De nombreuses études se sont attachées à la compréhension de la pathogénicité du VWN et de ses mécanismes/déterminants en utilisant des clones infectieux de souches africaines, B956 (170), australiennes, Kunjin (38, 171) et surtout de la souche new-yorkaise, NY99 (55, 160, 172-175), mais peu à partir de souches européennes ou méditerranéennes. A ce jour, seuls les clones infectieux de la souche israélienne hautement virulente de lignage 1, IS-98-ST1 (176) et d'une souche (578/10) d'Europe centrale de lignage 2 (177) sont documentés.

L'objectif de mon travail était de caractériser les déterminants moléculaires de virulence de souches européennes ou méditerranéennes du virus West Nile. Pour atteindre cet objectif, je me suis appuyé sur le travail antérieur du laboratoire, à savoir la production d'un clone infectieux de la souche IS-98-ST1 (appelée Is98) (176). Cette souche est une souche hautement pathogène du virus West Nile ayant circulé dans le bassin méditerranéen en Israël en 1998 et ayant provoqué 35 cas chez l'homme et 18 chez le cheval en 1998, 417 cas chez l'homme et 76 chez

le cheval en 2000. Nous avons aussi utilisé la souche Italie 2008 (souche 229892, GENBANK : FJ483549). La souche Italie 2008 (It08) est réputée peu pathogène. Cette souche a été isolée lors d'une épidémie de faible envergure ayant eu lieu en Italie en 2008 et ayant provoqué 11 cas humains et 78 cas équins (121, 178). Des différences de virulence ont été observées lors d'infections expérimentales sur le poulet de 1 jour (124). Sur ce modèle la souche Is98 s'est révélée significativement plus létale que la souche It08. Les souches Is98 et It08 sont représentatives des différents sous-groupes de lignage 1 présents en Europe (179) et sont donc de bons modèles pour étudier les différences en terme de virulence du VWN. Qui plus est ces deux souches présentent elles aussi la mutation NS3 249 P et ont une homologie de séquence nucléotidique de 96% et protéique de 99,7%. Après un travail de comparaison des séquences nucléotidiques, onze mutations non synonymes ont ainsi été identifiées entre Is98 et It08.

Afin de pouvoir étudier et modifier à façon les propriétés biologiques d'un virus, des approches de génétique inverse peuvent être utilisées. Pour des virus à ARN simple brin de polarité positive, j'ai donc utilisé un clone infectieux contenant l'intégralité du génome viral d'une souche hautement pathogène du VWN au sein d'une construction plasmidique et permettant la synthèse d'ARN viraux et la production *in vitro* de virus infectieux de séquence connue.

Mon projet de diplôme EPHE consista en un travail de biologie moléculaire, faisant appel à la construction de virus chimères (par échange de fragments génomiques entre les souches Is98 et It08 du VWN) et d'un mutant (NS3 249 P→T) à partir du clone infectieux Is98 disponible au laboratoire et en la caractérisation de leurs propriétés biologiques dans des lignées cellulaires *in vitro* et dans des modèles *in vivo* (souris, modèle mammifère permettant l'évaluation de la virulence du virus West Nile, et oiseaux : poussin de 1 jour en partenariat avec le CERVA CODA, Belgique). Il a été décidé de choisir deux modèles différents pour mimer le comportement de nos virus à la fois chez leur hôte réservoir (modèle aviaire sensible) et chez un hôte mammifère sensible. Les deux présentant des différences comme explicité dans l'introduction. Les interactions avec l'hôte vertébré uniquement ont été investiguées ici.

Le clone infectieux Is98 a été modifié afin d'intégrer la mutation NS3-P249T (85) ou d'échanger les fragments génomiques provenant de la souche Italie08 (It08) comportant des mutations non synonymes entre Is98 et It08. En fonction des sites de restriction uniques disponibles pour les constructions, quatre chimères ont été envisagées au début de mon travail.

Pour rappel l'infection à virus West Nile chez le cheval est un danger sanitaire de catégorie 1 (de par son caractère zoonotique et la sévérité de l'infection chez le cheval et l'homme) et doit faire l'objet d'une déclaration auprès de la DDPP concernée ainsi qu'une manipulation en P3.

Matériels et Méthodes

Afin de pouvoir étudier et modifier à façon les propriétés biologiques d'un virus, on peut utiliser une construction clone infectieux contenant l'ensemble du génome viral et permettant la synthèse d'ARN viraux et la production *in vitro* de virus infectieux de séquence connue. Des virus chimères (par échange de fragments génomiques entre différentes souches du VWN) ou de mutants à partir du clone infectieux Is98 ont été obtenus au sein du laboratoire (176).

La caractérisation de leurs propriétés biologiques a été réalisée dans des lignées cellulaires *in vitro* et *in vivo* (modèle mammifère et modèle aviaire). L'étude *in vivo* a pour finalité d'appréhender plus finement les déterminants moléculaires de la virulence des souches européennes du VWN et d'améliorer la pertinence et la rapidité de caractérisation de ces déterminants de virulence. L'objectif à long terme est de pouvoir déterminer rapidement le potentiel épidémique d'une souche de VWN émergent sur la base de sa caractérisation génétique et évaluer l'impact de nouveaux changements génomiques identifiés sur sa virulence et son potentiel endémique ou épidémique.

I. Construction du mutant NS3 P249T

Nous avons utilisé le clone infectieux dérivant d'une souche sauvage de VWN (IS-98-STD1, Genbank accession no: AF481864) développé par Bahuon *et al.*, 2012 (176). Le clone infectieux de type sauvage est caractérisé par un génotype NS3-249Pro et est donc appelé par la suite "WT Pro". Un mutant NS3-249Thr a été généré en remplaçant le codon CCC (nucléotides 5357-5359) par un codon ACC sur le clone infectieux de type sauvage en utilisant le kit de mutagenèse dirigée par site QuickChange® (Stratagene®, La Jolla, Ca). Le clone infectieux mutant est caractérisé par un génotype NS3-249Thr et est donc appelé ici "mutant Thr". Un site de restriction Sac II a également été généré (par insertion d'une mutation silencieuse) afin d'identifier facilement les virions Thr mutants après RT-PCR en utilisant les amorces ci-dessous, suivis d'une digestion enzymatique SacII sur les amplicons:

- 5053F 5'-GGGCTTTATGGCAATGGAGTCA-3'

- 5396R 5'-TGGGTGAGGGTAGCATGACA-3'.

Les virus recombinants ont été recueillis et titrés comme décrit dans Bahuon *et al.*, 2012 (176) après une période d'incubation de 3 jours pour WT Pro et 5 jours pour les virus Thr mutants.

II. Constructions pour la production de chimères Is98/It08

J'ai construit des chimères entre la souche IS-98-ST1 (GenBank : AF481864) et la souche It08 ; Italie 2008, 229892 (15803) (GenBank : FJ483549) : les chimères des régions du génome les plus variables entre les deux souches mentionnées, à savoir l'enveloppe (E), NS2A, NS4A-NS4B et NS5 ont été générées (figure 18). Toutes les constructions virales mentionnées dans ce rapport ont fait l'objet d'un dépôt de dossier auprès du HCB (dossier d'agrément n°251, avec autorisation de manipulation des productions virales en laboratoire confiné de classe 3 obtenue en date du 11 mai 2015).

Seule une partie des chimères a pu être obtenue à temps et a été caractérisée comme présenté ultérieurement (chimères 3 et 4).

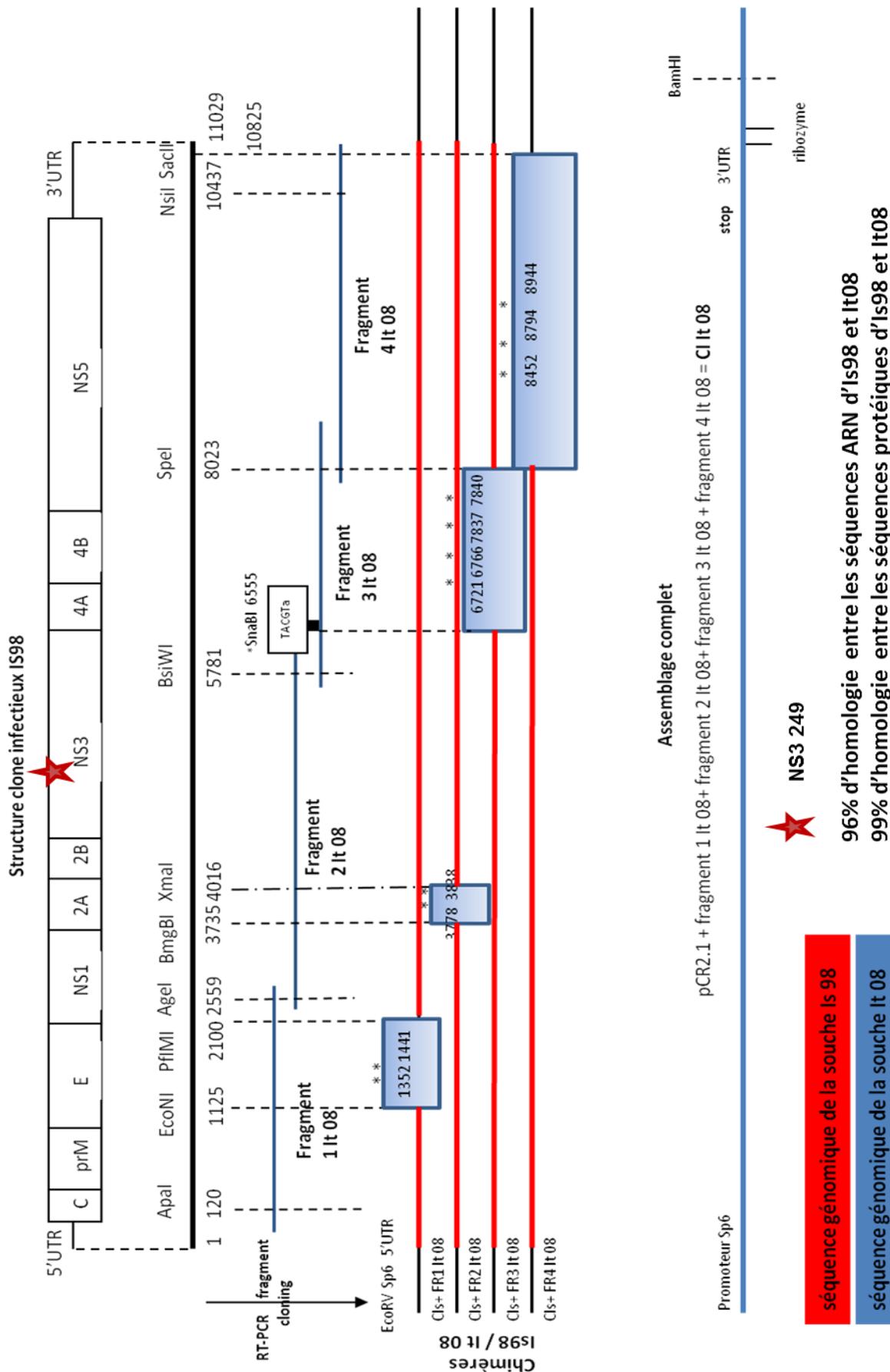


Figure 18 : Représentation schématique de la stratégie de clonage.

Le génome est approximativement à l'échelle. Cls= Clone infectieux Is98, FR= Fragment. Les mutations non silencieuses entre les souches Is98 et It08 sont matérialisées par des astérisques.

Afin d'obtenir ces chimères, les fragments It08 ont été amplifiés à partir d'un extrait d'ARN en utilisant les amorces rapportées dans le tableau 3 :

Fragment	Amorce Sens (5' → 3')	Amorce Anti-sens (5' → 3')
1	113F CGATGTCTAAGAAACCAGGAG	2605 R GTGGCGTTTCAGGGTAATAC
2	2557 F GATGTGGAGGCTTGGATGGAC	5822 R CATTITGGGTACTCCGTCTCG
3	5761 F CGTGCTGGAAAGAAAGTAGTC	8100 R GTAGAACACATCCACTCCACTC
4	7993 F GAAGTCAGAGGGTACACAAAGG	10894 R TCCTTCCCCTGACCTACA

Tableau 3 : amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'intérêt de la souche It08.

Les conditions d'amplification sont celles décrites dans Bahuon et al. (2012). Les fragments obtenus ont été clonés en plasmide pCR2.1 (Invitrogen). Les échanges de fragments entre les génomes It08 et IS98 ont été faits en procédant à une digestion enzymatique (tableau 4), suivie d'une ligation comme décrit dans Bahuon *et al.*, 2012 (176).

Fragment	Enzymes	Positions
1	EcoNI et PflMI	1125-2100
2	BmgBI et XmaI	3735-4008
3	SnaBI et SpeI	6551-8025
4	SpeI et SacII	8025-10825

Tableau 4: Sites de digestion enzymatiques utilisés pour l'insertion des fragments It08 dans le clone infectieux Is98.

Les fragments 1 et 2 ont été clonés dans le plasmide A (figure 19), car les sites de restrictions utilisés n'étaient pas uniques dans le plasmide clone infectieux. Le génome complet est ensuite reconstitué en apportant la partie 3' du génome présente sur le plasmide B, voir figure 19 (176). En revanche les fragments 3 et 4 ont été clonés directement dans le plasmide clone infectieux.

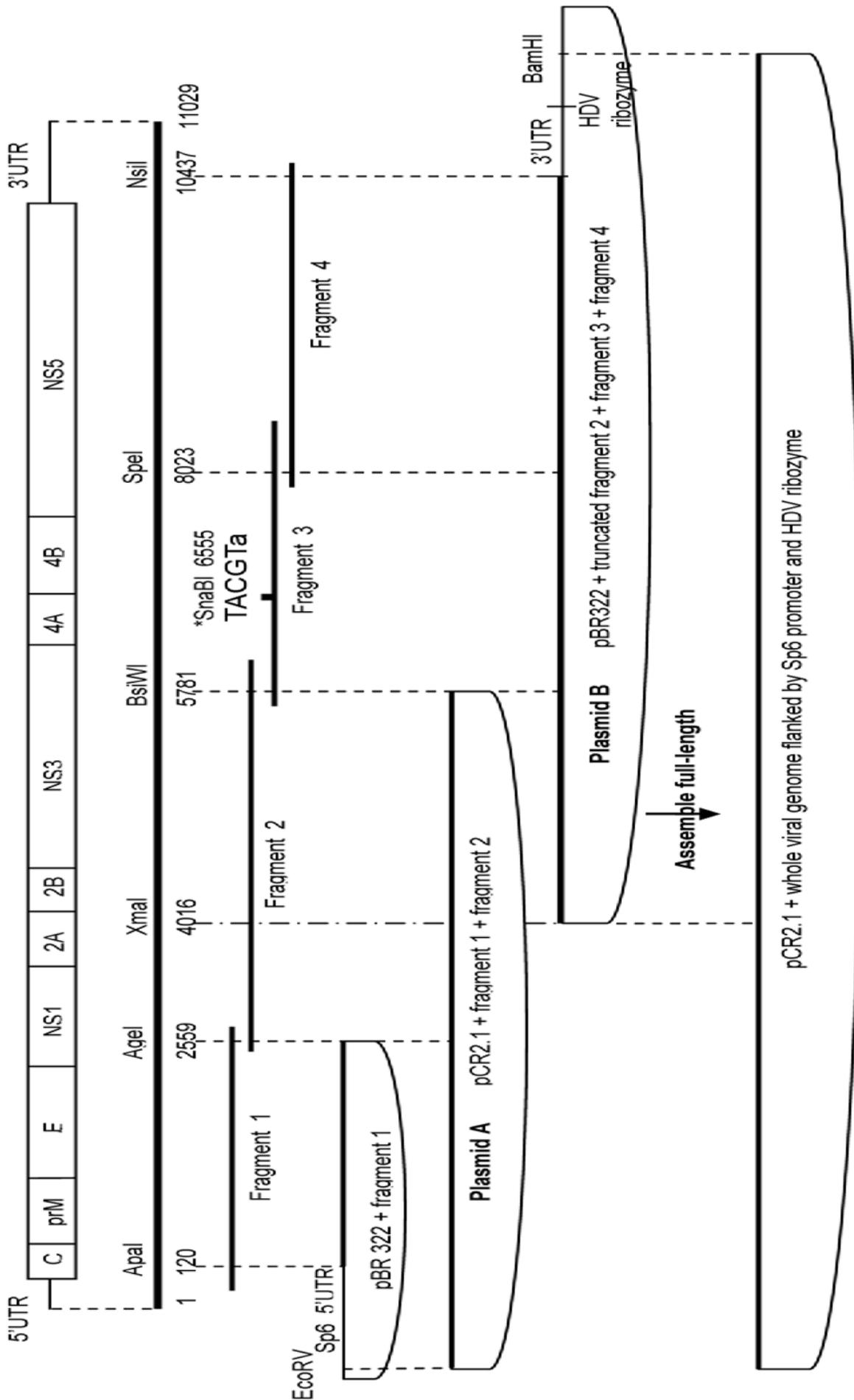


Figure 19 : schéma de la stratégie de clonage du clone infectieux Is98 (d'après Bahuon *et al.*, 2012 (176)).