

Thèse de doctorat

pour obtenir le grade de Docteur en Biologie Cellulaire et Moléculaire
délivré par L'Université des Antilles

École doctorale n°636 Dynamique des environnements dans l'espace Caraïbes- Amériques

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Lise Fiacre

Le vendredi 23 juin 2023 à Petit-Bourg, Guadeloupe

Identification des éléments génétiques du virus West Nile impliqués dans la transmission vectorielle et dans la virulence chez l'hôte.

Directeur de thèse : **Emmanuel Albina**, DMV, PhD, HDR, CIRAD

Co-directrice de thèse : **Sylvie Lecollinet**, DMV, PhD, HDR, CIRAD

Encadrante scientifique : **Gaëlle Gonzalez**, PhD, ANSES

Co-encadrant scientifique : **Nonito Pagès**, PhD, CIRAD

Composition du jury :

Sara Moutailler , Directrice de recherche, directrice d'Unité BIPAR, ANSES	<i>Rapporteuse</i>
Yannick Simonin , Professeur d'Université, chef d'équipe, Université de Montpellier	<i>Rapporteur</i>
Anubis Vega-Rua , Responsable du laboratoire d'étude sur le contrôle des vecteurs, Institut Pasteur	<i>Examinatrice</i>
Frédéric Arnaut , Directeur de recherche, directeur adjoint d'Unité, INRAE	<i>Examineur</i>
Olivier Gros , Professeur d'Université, responsable d'équipe, Université des Antilles	<i>Président du jury</i>

Je dédie ce manuscrit à mon grand-père, Albert Bouque.

Le parfum des lilas

Ouganda, 1937

L'amour du voyage, l'amour de la photographie et l'amour des oiseaux. Ces quelques mots résument à eux seuls la joie de vivre d'un vieil homme, amoureux de la vie. Ce vieil homme, c'est mon grand-père. Et depuis le plus jeune âge je suis émerveillé de ses histoires, toutes plus farfelues les unes que les autres. Je me souviens d'une, en particulier qui avait marqué mon esprit lorsqu'il me l'avait contée un soir d'été. Vous savez, ces soirées où la nuit semble ne jamais tomber et où les langues se délient pour laisser parler nos plus beaux souvenirs. Cette fois-là, son histoire se déroulait un mois de juillet, en 1937. Il se rendait au bord du Nil, dans une petite province nommée Ouganda, pour photographier des oiseaux sauvages. Il venait à la rencontre de ces énormes bêtes ailées, pourvues d'un gros bec, ressemblant à d'immenses cigognes, pour la première fois. « Bec-en-sabot » du Nil appelait-il ces géants volants. Amusé, il me racontait que l'ivresse de l'aventure lui avait presque fait oublier son appareil à photographier. A son arrivée, les habitants du village l'accueillirent autour d'un bon repas. Le lendemain, au lever du soleil, il s'était empressé d'arpenter les chemins pour voler à la rencontre de ces nouvelles créatures. Autour de lui, tout était calme, la brume matinale se levait. Il voguait sur des sentiers qui se dessinaient au fur et à mesure de ses pas, émerveillé par les somptueux paysages qu'il rencontrait pour la première fois. Puis soudainement au loin, il vit des masses plus foncées, au sol, près de l'eau. Sûrement ces grands oiseaux, en train de s'abreuver. Plus il s'approchait et plus les silhouettes se définissaient. Leur immobilité attirait alors son attention. « Pourquoi diable ces oiseaux ne volent-ils pas ? » se répétait-il. Il s'apprêtait à éclaircir le mystère. Des becs trop lourds ? Des ailes trop petites ? Commissaire de police retraité, il s'impatiait à l'idée d'élucider cette énigme qui se présentait à lui.

Une fois arrivé à quelques pas de ces masses sombres, la déception l'envahit. Les oiseaux étaient bien immobiles, mais une odeur nauséabonde s'échappait des dizaines de carcasses sans vie qui jonchaient le sol de cette petite province africaine. Il repartit, au village, attristé de ce qu'il venait de voir, en cherchant une explication auprès des villageois. Étrangement, une jeune femme avait été emportée quelques jours auparavant sans qu'aucune cause n'ait pu être identifiée.

New York, 1999

Je n'ai jamais oublié cette histoire de « Bec-en-sabot » contée par mon grand-père en cette soirée d'été. Lorsque j'y repense, je me souviens encore de l'odeur des lilas en fleur qui parfumaient la terrasse où nous nous étions assis pour papoter. En 1999, je me rendais à New York pour un nouveau tournant dans ma carrière de journaliste. Je devenais directeur d'un petit journal de quartier, le York.

Un matin en lisant le « New York Times » avec mon indispensable café matinal, je vis une rubrique qui portait sur « La mort massive d'oiseaux migrateurs », puis en même temps, une autre sur des cas de morts subites chez des personnes vivant à proximité de ces oiseaux... tiens tiens... cela me rappelait quelque chose. Brutalement, je pensais à cette histoire contée par mon grand-père. Ma curiosité me poussait à en apprendre plus à ce sujet. Je me rendais directement à l'hôpital, au « 462 1st avenue », où les malades avaient été placés, pour interroger des médecins. Après quelques semaines, il leur semblait avoir identifié la source du problème, à la une du « New York Times », je lus « Un virus qui fait tourner la tête ! ». Le temps de me plonger dans les quelques lignes qui s'étendaient sur cette première page et je compris. Il semblait que ce virus pouvait non seulement se retrouver chez les Hommes mais bel et bien aussi chez les oiseaux, atteignant le cerveau de façon parfois mortelle.

Ah si j'avais pu dire ça à mon grand-père ! Tant de mystère élucidé ! Probablement que le virus qui apparut ce jour-là à New York était un dérivé de celui qui avait quelques années auparavant décimé les « Bec-en-sabot ». « West Nile », ou « virus du Nil occidental ». C'est ainsi qu'il fut nommé en mémoire de sa découverte en 1937 aux abords du Nil.

Fallait-il encore maintenant comprendre son fonctionnement, ses plans pour le futur ! Pourquoi attaquait-il les oiseaux ? Pourquoi les Hommes ? Qui d'autres ? Et comment ? Comment avait-il pu franchir l'Océan Atlantique et se retrouver dans une des villes les plus peuplées du monde, lui qui, à l'origine, se trouvait dans un petit village d'Afrique ? Tant de questions se soulevaient, et je décidais de ne pas en rater une miette, cela ferait mon prochain article. Je m'apprêtais alors à suivre de près les scientifiques, de plus en plus nombreux à s'intéresser à ce nouveau virus.

France métropolitaine, 2002

Ils commençaient à comprendre... chaque fois que les oiseaux se déplaçaient, le virus se dispersait à la surface du globe, suivant les courants migratoires. Il ne faisait plus aucun doute que les oiseaux emmenaient avec eux cette petite bête mortelle. Mais qui sont ses complices... si petit, si insignifiant, il ne peut pas œuvrer seul ! Je me renseignais encore... Je remarquais qu'il se retrouvait principalement dans des zones colonisées par les moustiques, comme la Camargue ou les zones tropicales... Peut-être agissent-ils de concert ? Intéressant !

Guadeloupe, 2012

Cette année-là, j'allais rendre visite à une tante. De bon matin, j'entendis dans les médias que le virus West Nile semblait avoir été identifié chez des poulets, dans une ferme à proximité de la mangrove de Baie-Mahault. Ça y est ! J'en suis sûr ! Mes lectures scientifiques m'ont permis de confirmer le rôle des moustiques dans la transmission de ce virus chez les oiseaux... en voilà une belle paire ces deux-là ! C'est alors que ma tante me parla d'une équipe, de chercheurs, eux-mêmes très intéressés par le sujet. Leur travail était de comprendre l'intimité de ce virus. Son identité. De le décortiquer, pour mieux le cibler et le stopper. Je décidais alors de les suivre quelques mois, nul doute qu'ils allaient faire l'objet de mon prochain article. Je l'écrirai un soir de juillet, lorsque l'odeur des lilas nous transporte dans nos songes d'été.

Par Lise Fiacre

Concours 2022 « Prendre les sciences en conte ! » organisé par l'AUF Caraïbes

Vulgarisation scientifique d'un projet de recherche, sous forme de conte.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Sara Moutailler, Yannick Simonin, Anubis Vega-Rua, Frédérick Arnaud, et Olivier Gros d'avoir accepté de participer au jury de mes travaux de Thèse. Merci Sara Moutailler et Yannick Simonin d'être rapporteurs pour ce manuscrit.

Merci également à l'ensemble des mes encadrants de Thèse, Emmanuel Albina, Nonito Pagès, Sylvie Lecollinet et Gaëlle Gonzalez. Merci Emmanuel de m'avoir permis de réaliser ce projet de Thèse, de m'avoir fait confiance et accompagnée tout au long de ces années. Merci d'avoir répondu présent à chacune de mes demandes. Merci Nonito Pagès de m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche et de Veille sur les maladies vectorielles dans la Caraïbe (CIRAD). Merci de m'avoir ouvert les portes de l'entomologie terrain et de m'avoir enseigné l'identification des espèces. Mes remerciements les plus chaleureux vont à Sylvie et Gaëlle, qui m'ont accompagnée depuis le début de cette aventure :

- Sylvie, nous avons toutes les deux tenté l'aventure de partir découvrir de nouveaux horizons au CRVC. Nous avons pu évoluer ensemble dans ce nouvel environnement, et t'avoir à mes côtés a toujours été pour moi très rassurant. Je te remercie de m'avoir soutenue à toutes les étapes, mêmes les plus complexes. Ta connaissance sans faille à l'égard du virus West Nile, ta détermination, ta bonne humeur et ton enthousiasme sont d'autant de qualités qui rendent le travail à tes côtés agréable. Enfin je te remercie également pour tes qualités humaines d'écoute et de bienveillance.
- Gaëlle ! je ne sais pas par quoi commencer... les mots me manquent pour te dire à quel point je te remercie, pour ton aide et ton accompagnement sans relâche tout au long de cette Thèse. Merci de m'avoir enseigné les bases de la virologie à mon arrivée à l'ANSES en tant que novice 😊 merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir toujours encouragé. Ton savoir et ta pédagogie sont des qualités essentielles qui m'ont permis d'apprendre et d'évoluer tout au long de ces années. Je t'adresse mes remerciements les plus sincères pour m'avoir permis de finaliser mes expérimentations à tes côtés, merci d'avoir déployé toutes les ressources nécessaires pour que je puisse réaliser ce projet de Thèse. L'apprentissage à tes côtés a toujours mêlé beaucoup de compétence, de bienveillance, d'amusement, de fiabilité et de réussite. Les mots me manquent pour te décrire la profonde reconnaissance que j'ai pour toi. Il me tarde que tu viennes découvrir la Guadeloupe et que l'on puisse enfin profiter du soleil et des cocotiers !

J'adresse également mes remerciements à Pascal Boireau, directeur du laboratoire de santé animale de l'ANSES de m'avoir accueilli au sein de l'UMR VIRO.

Je remercie Nathalie Vachier, directrice de l'UMR ASTRE pour son accueil au sein de son unité, particulièrement au sein du CRVC en Guadeloupe.

Un grand merci également à Stéphan Zientara, directeur de l'UMR VIRO à l'ANSES, de m'avoir accueillie lors de ma première année de Thèse et de m'avoir réaccueillie pour les derniers mois, me permettant de finaliser l'ensemble des expérimentations. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser des expérimentations au sein de l'Institut Pasteur de Paris, notamment auprès d'Anna-Bella Failloux et de son Unité Arbovirus et Insectes Vecteurs.

Je remercie Antoine Nougairède, de l'UMR Émergence et Pathologies Virales à l'Université d'Aix-Marseille, de m'avoir accueillie et enseigné la technique de génétique inverse « ISA ». Merci également à l'ensemble des membres de son équipe pour leur aide, leurs conseils, et leur sympathie. Merci à Maxime Cochin de m'avoir accompagnée tout au long de ce stage.

Je remercie toute l'équipe ZEN de l'UMR VIRO, celles qui y sont toujours et celles parties vers de nouveaux horizons. Merci Nolwenn Dheilley pour ton accueil au sein de l'équipe pour ces quelques mois de fin de Thèse.

Merci Cécile Beck, pour ta bonne humeur, ta simplicité, et tes bons conseils lors de ma première année de Thèse à vos côtés. Merci Rayanne, d'avoir été un petit rayon de soleil au sein de l'équipe pendant quelques mois !

Un merci tout particulier à cette équipe de choc : Camille Migné, Marine Dumarest, et Teheipuaura Helle ! Merci les filles, pour votre soutien, votre aide, votre écoute. Merci pour votre bonne humeur, merci d'avoir joué le jeu et de m'avoir soutenu, comprise, motivée. Merci d'être restées soudées. J'ai trouvé en vous toute la force nécessaire pour ne jamais rien lâcher, et aller jusqu'au bout. Grâce à vous, j'ai plus que jamais compris l'importance d'avoir une équipe forte et soudée, prête à s'entre-aider.

- Ma p'tite Camille (KK pour les intimes), tu as été, et es pour moi une réelle source d'inspiration. La motivation, l'investissement et la bonne volonté sont des qualités naturelles dont tu disposes et que tu n'hésites pas à offrir à ton équipe. Merci pour ça. Je suis certaine que tu auras une belle carrière bien méritée. Je ne te souhaite que le meilleur, rempli de belles collaborations, publications, découvertes. Que ton chemin soit jonché d'épanouissement. Passé ce côté très sérieux, t'es vraiment une beauf et c'est quand même chouette de pouvoir chanter Britney Spears avec toi au P3 ! Merci d'être nature peinture, drôle et authentique ! Minou a de la chance d'avoir une maman comme toi.
- Marine, merci d'avoir été là depuis le début. Ton savoir technique est sans faille et ça a été un réel plaisir de pouvoir s'appuyer sur tes connaissances. Merci de t'être sur-motivée dans l'analyse de moustiques ! Ta curiosité est un réel atout pour avancer dans les différents projets. Merci d'avoir été à l'écoute, au labo ou autour des bières au Bar Belge 😊
- Ma petite fleur rouge Teheipuaura (j'espère que je ne me trompe pas dans la signification !) quel bonheur de te rencontrer. Ta bonne humeur, ton enthousiasme et ta sincérité ont fait de toi une réelle amie avec qui j'ai apprécié partager du temps. C'est vrai qu'il fait plus gris à Paris qu'à Tahiti, mais on peut presque se croire au soleil lorsque tu mets tes musiques « caliente » au P3 ! Je te souhaite beaucoup de belles choses pour la suite, pour ta vie perso ou pro (mais surtout perso ! 😊)

J'adresse également mes remerciements à ce super bureau (bien que relativement délabré, aka l'eau qui coule sur le bureau en cas de pluie) composé de filles vraiment chouettes. J'ai nommé... le bureau des doc/post-doc, avec Marine, Noémie, Caro, Stacy et Kamila. Merci les filles pour votre soutien, pour les moments passés ensemble, pour nos discussions enrichissantes. Merci aussi pour cette dernière petite bière avant mon départ. Un merci particulier à toi Caro, pour tes dessins savants sur l'anatomie génitale du moustique mâle 😊 Merci surtout d'avoir été à l'écoute, présente et toujours de bons conseils. J'ai été très chanceuse de te rencontrer et je ne te souhaite que le meilleur pour la suite.

Je remercie aussi l'ensemble des filles qui ont composé l'ancien bureau des doctorants, Morgan, les Manon, Roulietta (ma petite Juliette) et notre super poisson Bettadine ! Merci aussi d'avoir gaiement aménagé ce bureau en serre grandeur nature.

J'adresse mes remerciements chaleureux à Anna-Bella Failloux ainsi qu'à toute son équipe Unité des Arbovirus et Insectes Vecteurs de l'Institut Pasteur de Paris. Merci de m'avoir enseigné vos savoir-faire en entomologie et de m'avoir permis de finaliser ce projet. Un merci tout particulier à Marie Vazeille, qui m'a suivie tout au long de ce stage, avec une motivation sans faille. Merci Malika pour nos petites discussions en entomo, merci Marine pour ton accueil enthousiaste et ton aide dans les manips.

Je remercie également l'ensemble des membres du CRVC, Valérie Rodrigues, Damien Meyer, Eric Etter, Yolaine Vincent, Rosalie Aprelon, Kaïssa Plaisir, Maëlle Bayet, Naomie Pature, Mélanie Dhune, Lucie Lecat, Lorelei Corsaut, Emeric Gendron et l'ensemble des stagiaires côtoyés durant ces années. Merci pour les mots échangés, les pauses café et votre bonne humeur. Je remercie également chaleureusement Stéphanie Silou, ancienne thésarde au sein du CRVC, merci pour tes encouragements, ta bienveillance et ta sincérité. Je ne te souhaite que du bonheur.

- Kaïssa, tu fais partie de ces piliers solides du CRVC, et pour ça je te remercie. Ton sérieux, ta fiabilité, ton efficacité sont des atouts essentiels pour ce laboratoire et pour toute nouvelle personne qui y arrive. Je te remercie également pour l'ensemble de ces pauses déj' qu'on a pu passer toutes les deux à discuter à cœur ouvert. Merci pour ton écoute, ta sympathie, et tes conseils mode ! :P Je suis profondément fière que tu aies pu obtenir ce poste de cadre et je suis persuadée que toutes tes qualités humaines et professionnelles t'emmèneront encore très loin, c'est en tout cas tout ce que je te souhaite sincèrement.
- Maëlle... comment dire. Nos discussions sont tellement sincères que je crois que tu sais tout, depuis le premier jour et jusqu'à maintenant ! Je ne suis même pas sûre d'avoir encore en tête la diversité de tout ce pour quoi je veux te remercier... Mais il va sans dire que cela inclue, la pose de pièges sur le terrain (et ton accélération en 10 secondes pour s'insérer sur une route nationale après avoir déposé des pièges dans un lieu tout à fait douteux), et puis les gorgements en P3 jusqu'à 22h, tout ça pour voir un malheureux *Cx. atratus* se gorger de sang (et mourir deux jours après ^^). Merci de ton aide au P3, merci de t'être prise au jeu de cette drôle d'aventure qu'est le gorgement de moustiques du terrain. Et merci d'être restée positive quoi qu'il en soit (surtout quand moi je ne l'étais pas). Mais au-delà de ça, merci d'être une amie sur qui on peut compter, je suis très chanceuse d'avoir croisé ton chemin.
- Lorelei, quelle femme incroyable ! Tu es pour moi une source d'inspiration, incarnant le girl power. Je suis admirative de tout ce que tu as déjà réalisé, tant de voyages, tant de changements auxquels tu as dû t'adapter tout au long de ta carrière. C'est un plaisir de travailler dans le bureau juste à côté du tien, et surtout de partager des week-ends à la plage pour se ressourcer. Vivement qu'on prenne quelques vacances !
- Mélanie, ou Mélanight, ou Mon Seigneur ; ton arrivée au labo a été une bouffée de bonne humeur. Je ne sais pas ce que t'en penses mais je crois que le crabe d'Asie c'est un vrai fléau et qu'il faut s'en inquiéter rapidement avant qu'il ne colonise les océans. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton soutien et toutes les sorties faites pour décompresser !

Je remercie également Charlotte et Fleurine, mes anciennes super colocos aux côtés de qui j'ai commencé l'aventure Guadeloupe, merci FloFlo, merci Leïla, Jules (Roulio pour les intimes), Clément, merci à toutes les personnes rencontrées aux Bambous. Merci à mes copines de toujours Anaïs, Lise et Magalie. Ma Gigi, les années qui passent ne font que renforcer notre amitié, merci à toi pour ta présence sans faille. Merci Fredo pour nos discussions toujours enrichissantes. Merci Charlotte E et Yanis, pour vos encouragements, votre soutien et vos conseils. Merci Messir Maëlle Monier. Quel bonheur de t'avoir rencontrée, merci pour tout ce que tu es. Merci Marie et Boucar pour nos discussions de thésards. Merci à mon petit rayon de soleil Mathilde qui est maintenant parti à la Réunion. Merci à mon groupe de sport et ma coach Nadia, pour ton énergie entraînant !

Je remercie du plus profond de mon cœur, ma famille, mes deux grands frères Etienne et Matthieu, même à l'autre bout du monde mon cœur est tous les jours avec vous. Merci d'avoir été et d'être là à chaque étape de ma vie, qu'elle soit joyeuse ou plus compliquée, je peux sans cesse compter sur vous, sur vos conseils et votre écoute. Je remercie également mes parents Anne et Lionel, pour leur aide sur absolument tous les aspects de ma vie. Merci d'être un socle solide sur lequel je peux me reposer depuis des années pour apprendre et grandir en toute sérénité.

Et enfin, Merci Lucas, qui m'a épaulé dans cette aventure depuis quelques temps maintenant. Merci pour ta compréhension, ton soutien, tes bons p'tits plats et ton humour. J'espère que l'avenir nous réserve de bons moments, avec Minousse.

Merci également à tous ceux que j'ai peut-être oublié tant la liste est longue. Merci à ceux qui ont de près ou de loin participé à ce projet !

Liste des abréviations

A

ADAR : adénosine désaminase agissant sur l'ARN

Ae : *Aedes*

Ago-2 : argonaute 2

AMCR : corneille d'Amérique (*Corvus brachyrhynchos*)

B

BHE : barrière hémato-encéphalique

BMEC : cellule endothéliale microvasculaire cérébrale

C

C : capside

CAM : molécule d'adhésion cellulaire

CAPS : syndromes fébriles périodiques associés à la cryopyrine

CHIKV : virus du Chikungunya

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CMV : cytomégalovirus

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CPEC : clonage d'extension circulaire par polymérase

CRVC : Centre de Recherches sur les maladies Vectorielles dans la Caraïbe

CS : séquence de cyclisation

Cs : *Culiseta*

Cx : *Culex*

D

DAMP : motifs moléculaires associés aux dommages

DI, DII, DIII : domaine I, domaine II, domaine III de l'enveloppe des flavivirus

DC : cellules dendritiques

DC-SIGN : récepteur d'antigène ICAM non-intégrine, spécifique aux cellules dendritiques

DC-SIGNR : récepteur d'antigène ICAM non-intégrine, spécifique aux cellules dendritiques et homologue à

DC-SIGN

DENV : virus de la Dengue

DNAM-1 : molécule accessoire DNAX-1

E

ECDC : Centre Européen de Contrôle et de Prévention des maladies

E : enveloppe

F

FMF : fièvre méditerranéenne familiale
FR : forme réplivative

H

HIV : virus de l'immunodéficience humaine
HOPI : pinson domestique (*Fringilla coelebs*)
HOSP : moineau domestique (*Passer domesticus*)
HP : structures en épingles à cheveux
HTLV-1 : virus T-lymphotropique humain 1

I

ICAM : molécule intracellulaire d'adhésion
IFIT2 : protéine induite par l'interféron avec des répétitions de tétratricopeptide 2
IFN : interféron
IFNAR : récepteur à l'interféron alpha/beta
IL : interleukine
Imd : déficience immunitaire
IgG : immunoglobuline G
IgM : immunoglobuline M
IR : intermédiaire de réplification
IRF : facteur régulateur de l'interféron
ISA : amplicons subgénomiques infectieux
IS98 : Israël 1998
ISG : gène stimulé par l'IFN
ISGF3 : facteur génique stimulé par l'interféron 3
IT08 : Italie 2008

J

JAK1 : janus kinase 1

K

KUNV : virus Kunjin

M

MAL : adaptateur MyD88-like
MAVS : protéine de signalisation antivirale des mitochondries
MDA5 : antigène 5 de différenciation des mélanomes
MIF : facteur d'inhibition de la migration des macrophages
MMP : métalloprotéase

N

NF- κ B : facteur nucléaire kappa-B
NLR : récepteur NOD-like
NOD : protéines du domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides
NS : non-structurale
nt : nucléotides
NY : New-York

O

Oc : *Ochlerotatus*

P

PAMP : motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBMC : cellule sanguine mononucléaire périphérique
PECAM-1 : molécule d'adhésion des cellules endothéliales et plaquettaires
PFU : unité formant plage
PGRP-LC : protéine LC de reconnaissance des peptidoglycane de *Drosophila*
PK : pseudonœud
prM : pré-membrane
PRR : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

R

RC : complexe de réplication
RE : réticulum endoplasmique
RIG-I: RIG-I est un récepteur de reconnaissance de formes cytosoliques responsable de la réponse à l'interféron de type 1
RISC : complexe de silencing induit par l'ARN
RLR : récepteur RIG-I-like

S

S : structural
SL : stem-loop, structures tiges-boucles
SNC : système nerveux central
SPF : statut indemne des principaux agents pathogènes
STAT-1 : transducteur de signal et activateur de transcription 1

T

TAM : récepteurs Tyro3, Axl, MerTK
TBEV : virus de l'encéphalite à tiques
TICAM1 : molécule adaptatrice 1 contenant le domaine TIR
TIM : protéine contenant des domaines immunoglobuline des cellules T et mucine

TIR : Toll/Il-1 récepteur
TLR : récepteur Toll-like
TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha
TIRAP : protéine associée à TIR
TRAM : molécule adaptatrice liée au TRIF
TRIF : protéine adaptatrice TIR contenant un domaine TIR et induisant l'IFN- α
TYK2: tyrosine kinase 2

U

UTR : région transcrite mais non traduite

V

VCAM-1 : protéine vasculaire d'adhésion cellulaire

VWN : virus West Nile

W

WN : West Nile

Z

ZIKV : virus ZIKA

Liste des figures

FIGURE 1. REPRESENTATION DE LA DISTRIBUTION DU VWN SUR LE GLOBE.....	7
FIGURE 2. COURANTS MIGRATOIRES A LA SURFACE DU GLOBE ET INFLUENCE SUR LA DISPERSION DU VWN.	8
FIGURE 3. COURANTS MIGRATOIRES DES ESPECES AVIAIRES ENTRE L'EUROPE ET L'AFRIQUE.....	8
FIGURE 4. REPARTITION DES CAS EQUINS (A) ET HUMAINS (B) EN EUROPE EN 2018.....	10
FIGURE 5. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES PRINCIPALES SEQUENCES COMPLETES DE GENOMES DES PRINCIPALES LIGNEES DU VWN.	12
FIGURE 6. LIGNEES DU VWN REPORTEES POUR 17 PAYS AFRICAINS.	13
FIGURE 7. ARBRE PHYLOGENETIQUE DE LA LIGNEE 1 DU VWN.....	14
FIGURE 8. DISTRIBUTION MONDIALE DES VWN DE LIGNEE 1 DONT LES SEQUENCES COMPLETES SONT CONNUES.....	15
FIGURE 9. CYCLE DE TRANSMISSION DU VWN.....	16
FIGURE 10. STRUCTURE ET ORGANISATION DU GENOME DU VWN.	18
FIGURE 11. TRANSMISSION DU VWN ET CRITERES SELECTIFS MODIFIANT LE GENOME AU FIL DES CYCLES DE TRANSMISSION.....	22
FIGURE 12. CYCLE DE REPLICATION DU VWN.....	24
FIGURE 13. TRADUCTION, REPLICATION ET ASSEMBLAGE DES PARTICULES VIRALES.....	25
FIGURE 14. DISSEMINATION DU VWN CHEZ LES HOTES MAMMIFERES COMME L'HOMME.	27
FIGURE 15. LA FONCTION COORDONNEE DE TROIS BARRIERES CEREBRALES MAINTIENT LE CERVEAU HOMEOSTATIQUE ENVIRONNANT.....	29
FIGURE 16. MECANISMES D'ENTREE DU VWN DANS LE SNC.	32
FIGURE 17. ACTIVATION DES CELLULES IMMUNITAIRES A LA SUITE DE L'INFECTION AU VWN.....	41
FIGURE 18. DEROULEMENT DE LA REPOSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE AU VWN.....	43
FIGURE 19. PERIODE DE DETECTION DU GENOME VIRAL ET DES ANTICORPS A LA SUITE D'UNE INFECTION AU VWN.	44
FIGURE 20. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE DES CULICIDAE.	47
FIGURE 21. CYCLE DE VIE D'UN MOUSTIQUE DU GENRE CULEX.	48
FIGURE 22. IMAGE D'UNE FEMELLE CULEX PAPIENS EN TRAIN DE PONDRE SES ŒUFS A LA SURFACE DE L'EAU.	48
FIGURE 23. ANATOMIE D'UNE LARVE DE MOUSTIQUE DU GENRE CULEX.	49
FIGURE 24. ANATOMIE DU CULEX PAPIENS ADULTE FEMELLE.	50
FIGURE 25. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DU CULEX PAPIENS.	51
FIGURE 26. REPARTITION DES Cx. PAPIENS A LA SURFACE DU GLOBE.	52
FIGURE 27. PHOTOGRAPHIE D'UN Cx. ERRATICUS PRENANT SON REPAS SANGUIN SUR UN ANOLIS VERT, ANOLIS CAROLIENSES (REPTILE, DE LA FAMILLE DES DACTYLOIDAE).....	53
FIGURE 28. EXEMPLE DE FONCTIONNEMENT D'UN PIEGE CDC.....	55
FIGURE 29. EXEMPLE DE PIEGE FEMELLE GRAVIDE, AUSSI NOMME PIEGE-PONDOIR OU PIEGE OVIPOSITION.....	56
FIGURE 30. REPARTITION DES ESPECES DE MOUSTIQUES RETROUVEES POSITIVES EN RT-QPCR POUR DETECTION DU VWN EN ITALIE, ENTRE 2008 ET 2012.	57
FIGURE 31. ÉTAPES DE DISSEMINATION ET REPLICATION DU VWN CHEZ LE MOUSTIQUE.....	63
FIGURE 32. DISSEMINATION VIRALE DU VWN CHEZ Cx. PAPIENS QUINQUEFASCIATUS.	64
FIGURE 33. EXPRESSION DES miRNA DANS LES DIFFERENTES PARTIES DU CORPS D'UN MOUSTIQUE.....	67
FIGURE 34. REPRESENTATION DES DIFFERENTS MECANISMES PERMETTANT LA REPOSE IMMUNITAIRE CHEZ LE MOUSTIQUE.....	70
FIGURE 35. ÉVOLUTION DES PUBLICATIONS SUR WEST NILE REFERENCEES DANS PUBMED®.....	115
FIGURE 36. RESERVOIR DE STOCKAGE DE MOUSTIQUES VIVANTS POUR PIEGE CDC, REALISATION "MAISON".	198
FIGURE 37. ZONE DE CAPTURE, MANGROVE DE BAIE-MAHAULT.	199
FIGURE 38. POTS RENFERMANT LES MOUSTIQUES FEMELLES TRIEES, CIRAD, CRVC.	200

Liste des tableaux

TABLEAU 1. COMPARAISON SIMPLIFIEE DES DIFFERENTS MECANISMES DE REPOSE IMMUNITAIRE DECRITS CHEZ LE VECTEUR MOUSTIQUE, CHEZ L'OISEAU, OU CHEZ LES MAMMIFERES TELS QUE LE CHEVAL ET L'HOMME.	46
TABLEAU 2. ISOLEMENT DU VWN A PARTIR D'ARTHROPODES HEMATOPHAGES.....	59
TABLEAU 3. LISTE PARTIELLE DES PRINCIPAUX VACCINS DEVELOPPES SUR MODELE EQUIN POUR LE VWN.	72

Table des matières

I. Introduction: synthèse bibliographique sur le virus West Nile & les outils de génétique inverse **1**

1. Partie 1 : le virus West Nile	5
1.1. Épidémiologie d'un virus globe-trotteur	5
1.1.1. La naissance du virus West Nile	5
1.1.2. Le virus West Nile à la conquête du globe	5
1.1.3. Courants migratoires impliqués dans sa conquête du monde.....	7
1.1.4. 2018 : une année exceptionnelle de circulation du VWN en Europe.....	9
1.2. Classification phylogénétique	11
1.2.1. Phylogénie des différentes lignées du virus West Nile	11
1.2.2. La lignée 1 : une souche hautement pathogène	13
1.3. Cycle de transmission	15
1.3.1. Les cycles de transmission enzootique et épizootique	15
1.3.2. Voies de transmission chez l'Homme.....	16
1.4. Le génome viral	17
1.4.1. Les protéines structurales	19
1.4.2. Les protéines non-structurales (NS).....	19
1.4.3. Modifications génomiques au cours du cycle de transmission	20
1.5. Cycle de réplication chez le mammifère	22
1.6. Pathogenèse virale	26
1.6.1. Infection et dissémination.....	26
1.6.2. Atteinte du système nerveux central	28
1.6.2.1. Structure & fonction de la BHE.....	28
1.6.2.2. Mécanismes de franchissement de la BHE.....	29
1.6.2.3. Neuroinvasion par le VWN	30
1.6.2.3.1. Mécanisme de « cheval de Troie »	31
1.6.2.3.2. Perte de l'intégrité de la BHE, perméabilisation et passage paracellulaire du virus.....	31
1.6.2.3.3. Amélioration de l'attachement et de l'internalisation du virus par les cellules endothéliales ..	31
1.6.3. Modèles in vivo d'étude de la pathogenèse du virus West Nile	33
1.7. Manifestations cliniques	34
1.7.1. Manifestations cliniques chez l'oiseau.....	34
1.7.2. Manifestations cliniques chez l'Homme	34
1.7.3. Manifestations cliniques chez le cheval	34
1.8. Réponse antivirale chez le mammifère	35
1.8.1. Voies de signalisation impliquées dans la réponse antivirale	35
1.8.1.1. Activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs RIG-I-like (RLRs).....	35
1.8.1.2. Activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs Toll-like (TLR)	36
1.8.1.3. Activation de la réponse anti-VWN médiée par l'IFN de type I.....	36
1.8.1.4. Les récepteurs NOD-like (NLRs).....	37
1.8.2. Réponse immunitaire innée	38
1.8.2.1. Mécanisme de la réponse immunitaire innée.....	38
1.8.2.2. Contournement de la réponse innée par le virus West Nile	39
1.8.2.2.1. Évasion passive de l'interaction avec les PRRs	39
1.8.2.2.2. Inhibition active de la signalisation et de la production d'IFN de type I	39
1.8.3. Réponse immunitaire adaptative	42
1.8.3.1. Mise en place de la réponse adaptative.....	42
1.8.3.2. Détection d'anticorps IgG et IgM	44

1.8.4.	Impact du vieillissement sur la réponse immunitaire	45
1.9.	Réponse immunitaire chez l'oiseaux	46
2.	Partie 2 : Le vecteur moustique	47
2.1.	Classification phylogénétique.....	47
2.2.	Cycle de développement	48
2.3.	Anatomie d'un moustique.....	49
2.3.1.	Anatomie de la larve à l'adulte	49
2.3.2.	Identification morphologique d'un Culex pipiens	50
2.4.	Les espèces vectrices du VWN à travers le monde	51
2.4.1.	Les espèces vectrices sur le continent américain.....	52
2.4.2.	Les espèces porteuses du virus en Europe.....	54
2.4.3.	Les espèces porteuses du virus en Asie.....	57
2.4.4.	Les espèces porteuses du virus en Afrique	57
2.5.	Notion de compétence vectorielle, capacité vectorielle et période intrinsèque d'incubation.....	60
2.5.1.	Compétence vectorielle	60
2.5.2.	Capacité vectorielle.....	61
2.5.3.	Période extrinsèque d'incubation	61
2.6.	Dissémination chez le moustique	62
2.7.	Impact de Wolbachia dans la réplication chez le vecteur	65
2.8.	La réponse antivirale chez le vecteur moustique	65
2.8.1.	La régulation par les petit ARN interférents : exo-siRNA, piRNA et miRNA	65
2.8.1.1.	Les siRNA	66
2.8.1.2.	Les piRNA.....	66
2.8.1.3.	Les miRNA	67
2.8.2.	Les cascades de signalisations antivirales	68
2.8.2.1.	La voie du récepteur Toll.....	68
2.8.2.2.	La voie Imd	68
2.8.2.3.	La voie Jak/STAT	68
2.8.3.	Les processus d'autophagie et d'apoptose	69
3.	Partie 3 : Étude des déterminants moléculaires de virulence et développement de thérapies vaccinales	71
3.1.	Vaccins existants chez le cheval	71
3.2.	Rôle des déterminants moléculaire dans le développement de thérapies vaccinales	73
3.3.	Introduction à l'étude des déterminants moléculaires de virulence et de pathogénèse chez les hôtes vertébrés et invertébrés	74
3.4.	REVUE PUBLIEE: Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts	75
II.	Objectifs	113
III.	Résultats.....	117
1.	Introduction de la partie 1	119
1.1.	Partie 1: ARTICLE 1: Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR genetic determinants of WNV lineage 1 virulence in birds and mammals	121
1.2.	Discussion de la partie 1.....	145
2.	Introduction de la partie 2	147
2.1.	Partie 2: ARTICLE 2: Molecular markers present in the end of genome of two Mediterranean Basin West Nile virus strains, implicated in mammalian BALB/cByJ host virulence and Culex pipiens vector competence .	149
2.2.	Discussion de la partie 2.....	173
3.	Introduction de la partie 3	175
3.1.	Partie 3: ARTICLE 3: Proline residue at NS3 ₂₄₉ in a Mediterranean West Nile virus context confers increased virus replication and virulence in susceptible mammals and birds, but not in Culex pipiens mosquitoes	177
3.2.	Discussion de la partie 3.....	195

4.	Introduction à la partie 4	197
4.1.	Partie 4 : recherche d'espèces compétentes pour le virus West Nile en Guadeloupe	197
4.1.1.	Zones de capture.....	197
4.1.2.	Méthodologie d'infection.....	199
4.1.3.	Résultats préliminaires de l'étude de la compétence vectorielle de Culex atratus et de Deinocerites magnus	201
4.2.	Conclusion sur la partie 4	201
IV.	Discussion générale & perspectives	203
V.	Références	211
VI.	Annexes	233
1.	Réalisation de chimères virales entre les souches du VWN Israël 1998 et Italie 2008	235
1.1.	Séquences chimériques (Séquençage IonTorrent, CIRAD CRVC, Guadeloupe)	235
1.1.1.	Annexe 1 : Séquence IS98-3'UTR	235
1.1.2.	Annexe 2 : Séquence IS98-3'NS4B/NS5.....	239
1.1.3.	Annexe 3 : Séquence IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B	243
1.1.4.	Annexe 4 : Séquence IS98-NS2A/NS2B	247
1.1.5.	Annexe 5 : Séquence IS98-NS1.....	252
1.1.6.	Annexe 6 : Séquence IS98-5'UTR/C/prM/E.....	256
1.2.	Comparaison des mutations entre les chimères et la séquence parentale Israël 1998.....	261
1.2.1.	Annexe 7 : Séquence chimérique IS98-3'UTR vs séquence parentale Israël 1998.....	261
1.2.2.	Annexe 8 : Séquence IS98-3'NS4B/NS5 vs séquence parentale Israël 1998	262
1.2.3.	Annexe 9 : Séquence chimérique IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B vs séquence parentale Israël 1998.	264
1.2.4.	Annexe 10 : Séquence chimérique IS98-NS2A/NS2B vs séquence parentale Israël 1998.....	267
1.2.5.	Annexe 11 : Séquence chimérique IS98-NS1 vs séquence parentale Israël 1998	269
1.2.6.	Annexe 12 : Séquence chimérique IS98-5'UTR/C/prM/E vs séquence parentale Israël 1998	270
1.2.7.	Annexe 13 : Liste des mutations présentes sur le Clone Infectieux Israël 1998 (CI-IS-98).....	271
1.2.8.	Annexe 14 : Liste des mutations non-synonymes présentes entre les souches parentales West Nile Israël 1998 et West Nile Italie 2008	273
1.3.	Annexe 15 : Évaluation in vivo de la virulence des chimères : modèle murin BALB/cByJ	274
1.4.	Annexe 16 : Clé d'identification des moustiques de Guadeloupe	277
1.5.	Annexe 17 : Encadrement d'une stagiaire de Master 2 Biologie Santé, Option santé en milieu tropical (Université des Antilles, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles).....	282

I. Introduction: synthèse bibliographique sur le virus West Nile & les outils de génétique inverse

Le virus West Nile (VWN) a été découvert dans le district de West Nile, en Ouganda, en 1937 sur une femme présentant un état fébrile. Initialement, c'est un virus qui était considéré comme pas ou peu pathogène. Dès 1955 des tests d'infections expérimentales sur la Corneille (*Corvus corone*) ou le Moineau Domestique (*Passer domesticus*) ont permis d'identifier les oiseaux, notamment ceux de la famille des Passériformes (passereaux) comme des hôtes amplificateurs (Work, Hurlbut, and Taylor 1955). En parallèle, des échantillonnages sur le terrain ont montré que les moustiques, principalement du genre *Culex* sont les vecteurs de l'agent pathogène responsable de la maladie (Hurlbut et al. 1956). A partir de 1956, les travaux de Hurlbut *et al.*, permettent de schématiser le premier cycle de transmission du VWN. Aujourd'hui sa représentation a évolué, suite à l'obtention de preuves que les Hommes et les chevaux ne sont que des hôtes accidentels considérés comme culs-de-sac épidémiologiques. Toutefois, la transmission interhumaine peut s'effectuer de la mère à l'enfant, ou encore par le biais de transplantation d'organes et de transfusion sanguine.

Au début des années 1960, le VWN est enfin considéré comme un agent pathogène pour l'Homme. Si la plupart du temps, les infections restent asymptomatiques, quelques cas peuvent évoluer en un état fébrile et de très rares cas graves en une atteinte du système nerveux central, pouvant entraîner le décès de l'individu infecté.

C'est en 1998, que l'histoire du VWN prend un tournant plus sévère. Des vents violents perturbent la trajectoire migratoire de centaines de cigognes partant d'Europe du Nord et se dirigeant vers l'Afrique. Ces vents forcent les oiseaux à s'arrêter en Israël, où une très forte mortalité aviaire sera observée par la suite. Le virus isolé en Israël en 1998 présente un génome quasiment similaire à celui qui sera retrouvé lors de l'épidémie la plus dévastatrice due au VWN, décrite aux USA et initiée en 1999 à New York City, suggérant que ce dernier virus pourrait avoir été importé lui aussi par des oiseaux migrateurs infectés en provenance d'Israël. Toutefois, l'absence de couloir de migration entre Israël et les USA n'est pas en faveur d'une telle hypothèse, et l'introduction du VWN aux USA pourrait être due entre autres à l'introduction légale ou illégale d'oiseaux. Moins de dix ans après son émergence sur le continent américain, le VWN s'est propagé d'Est en Ouest du continent, entraînant de nombreux cas d'infections létales chez l'Homme, dans l'avifaune et chez les équidés (Hadfield et al. 2019). Cela a marqué les débuts de l'intérêt de la communauté scientifique pour ce virus avec notamment le développement de plusieurs vaccins pour prévenir l'infection des équidés. En revanche, aucun vaccin n'est actuellement disponible pour l'Homme. Aujourd'hui, le VWN est un virus zoonotique, considéré comme pathogène pour l'Homme et classé comme un virus de groupe 3.

Selon le code du travail, les agents biologiques sont en effet classés en quatre groupes, dépendamment de la gravité du risque d'infection qu'ils représentent pour l'Homme. Ainsi, les agents biologiques du groupe 1 ne sont pas susceptibles de provoquer une maladie chez l'Homme, le groupe 2 concerne les agents biologiques pouvant provoquer des infections chez l'Homme mais avec peu de risque de propagation et contre lesquelles un traitement existe le plus souvent, le groupe 3 comprend les agents biologiques pouvant entraîner des infections chez l'Homme avec un risque d'infections sévères pour le travailleur, un risque important de propagation et l'existence de traitements. Pour finir, les agents biologiques du groupe 4 sont considérés comme

les plus dangereux, avec des risques graves d'infection chez l'Homme, de propagation dans la collectivité et un réel danger pour le travailleur. La plupart du temps, pour les agents biologiques du groupe 4, il n'existe pas de traitement ou de prophylaxie.

La recherche pour le développement de vaccins se base essentiellement sur la compréhension des mécanismes de virulence et le développement de souches atténuées ou de protéines immunogènes. Les outils de génétique inverse (production de virus chimériques, virus mutés pour un ou plusieurs nucléotides) ont été développés et permettent actuellement de mieux comprendre les facteurs de virulence du VWN.

1. Partie 1 : le virus West Nile

1.1. Épidémiologie d'un virus globe-trotteur

1.1.1. La naissance du virus West Nile

La première suspicion d'une infection par le VWN remonte à près de 300 ans avant J.-C. lorsqu'Alexandre le Grand retourne à Babylone et est pris d'une fièvre dont il décèdera 10 jours plus tard. En parallèle, Plutarque décrit une hécatombe brutale de corbeaux. Bien que cela reste encore à l'état d'hypothèse, il n'est pas impossible que ces symptômes et cette mortalité soient imputables à une infection par le VWN (Marr and Calisher 2003). Toutefois, la première description du VWN date de 1934 en Ouganda avec un cas chez une femme originaire du *West Nile District* (Smithburn et al. 1940).

Treize ans après sa découverte, le VWN est isolé chez un Homme en Égypte (Melnick et al. 1951). Afin d'établir le taux de séroprévalence, des enquêtes sérologiques sont menées sur les Hommes le long du Nil (environ 60 à 80% de prévalence) Hurlbut et al. 1956). A l'origine, le VWN a été décrit comme peu pathogène. La première épidémie recensée date de 1951, où 40% des 300 habitants d'un village en Israël déclarèrent subir un état fébrile et des maux de tête (Bernkopf et al. 1953). Pour ce virus qui semble être originaire d'Afrique, on remarque une forte circulation du virus et une diversité génétique plus élevée en Afrique que sur les autres continents (May et al. 2011).

Tandis que le rôle des oiseaux comme hôte amplificateur a été mis en évidence par des infections expérimentales (Work et al. 1955), l'identification du vecteur s'est effectuée de façon aléatoire en recherchant la présence du VWN dans près de 80 000 arthropodes dont des moucheron, puces, moustiques ou tiques. Les premiers isolements viraux ont alors été effectués à partir de moustiques *Culex univittatus* ou *Culex antennatus* en Afrique (Hurlbut et al. 1956).

1.1.2. Le virus West Nile à la conquête du globe

La détection du VWN dans le bassin méditerranéen et notamment en France métropolitaine date de 1962 avec des cas chez les chevaux et chez l'Homme (Joubert et al. 1970) (Hoffmann et al. 1968). Après cela, le VWN n'a pas entraîné de cas avéré pendant plus de trente ans dans cette zone, avant de générer une nouvelle épidémie en 2000 (Durand et al. 2002). Depuis 2015, des cas d'infection sévère, neuro-invasive, sont observés chaque année, notamment chez les chevaux.

A partir de 1994, des épidémies et épizooties sont observées en Europe et dans le bassin méditerranéen (Murgue, Murri, Triki, et al. 2001). D'importantes épidémies ont notamment été observées en Roumanie et en Italie en 1996 et 1998 respectivement (Cernescu et al. 2000). En 1998, des cigognes blanches en migration depuis l'Europe du Nord vers l'Afrique doivent momentanément stopper leur trajectoire en Israël à la suite de vents violents. Une centaine de cigognes sont retrouvées mortes (Malkinson et al. 2002), après infection par le VWN. Cet épisode assez marquant pourrait être à l'origine de plusieurs épidémies. En effet, le virus introduit à New York en 1999, NY99, semble génétiquement très proche de celui isolé en Israël en 1998 (>99%) (Lanciotti et al. 1999), suggérant que l'épidémie débutée à New-York en 1999 aurait pu faire suite à l'arrivée du virus par des oiseaux migrateurs en provenance d'Israël. Néanmoins, d'autres hypothèses plus probables pourraient expliquer cette introduction, notamment l'importation légale ou illégale d'oiseaux potentiellement infectés ou encore l'introduction involontaire de tiques ou de moustiques infectés (Lanciotti et al. 1999).

Malgré plusieurs épidémies entre 1934 et 1999, ce n'est qu'après 1999, et notamment à la suite d'une forte épidémie à New York (lignée 1a) ainsi que la circulation régulière et l'expansion du virus sur le continent américain que l'intérêt pour le VWN s'intensifie. De 1999 à 2016, 7 millions de personnes ont été infectées, avec 24 000 cas d'infections neuro-invasives et 2 300 morts (Ronca et al. 2019). Le VWN est actuellement dispersé sur l'ensemble du globe, et est considéré comme le facteur le plus important d'encéphalites arbovirales aux Etats-Unis (Lanteri et al. 2011).

Après l'épidémie de New York en 1999, le VWN est identifié au Canada en 2002 (Gancz et al. 2004), ainsi qu'en Jamaïque (Dupuis et al. 2003), au Mexique (Barbachano-Guerrero et al. 2019), en Guadeloupe (Quirin et al. 2004) ou encore en République Dominicaine (Komar et al. 2003), avant d'être décrit en Argentine dès 2006 (Fig.1).

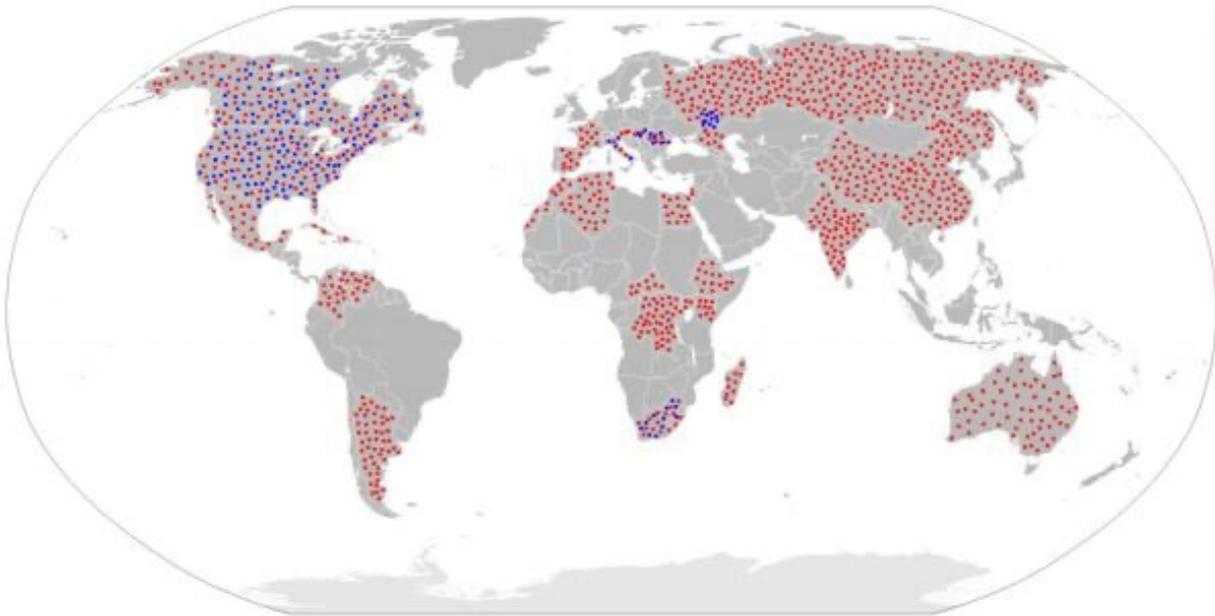


Figure 1. Représentation de la distribution du VWN sur le globe.

En rouge, les zones historiques de circulation du virus. En bleu, les zones avec isolement récent du virus à partir de 2007. Il s'agit aussi bien de cas humains, équins ou de virus retrouvés chez les moustiques. (Rossi et al. 2010)

1.1.3. Courants migratoires impliqués dans sa conquête du monde

Les oiseaux migrateurs peuvent jouer un rôle important dans la dispersion du virus à la surface du globe. Plusieurs courants migratoires (Fig.2) sont présents entre l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud, ou encore entre l'Europe et l'Afrique. Ces courants impactent directement la description d'épidémies dans certaines zones du globe. On peut en effet remarquer que la présence du VWN dans des zones telles que l'Amérique du Nord, l'Amérique du Sud ou encore l'Europe et l'Afrique, coïncide parfaitement avec les courants migratoires identifiés entre l'Amérique du Nord et l'Amérique du Sud, ou encore entre l'Europe et l'Afrique (Fig.3). De plus, des cas de moustiques positifs à l'infection au VWN au Canada (retrouvés sur des courants migratoires) alimentent le rôle des oiseaux migrateurs dans la dissémination du virus à la surface du globe (Public Health Ontario. Vector-borne diseases: 2016 summary report).

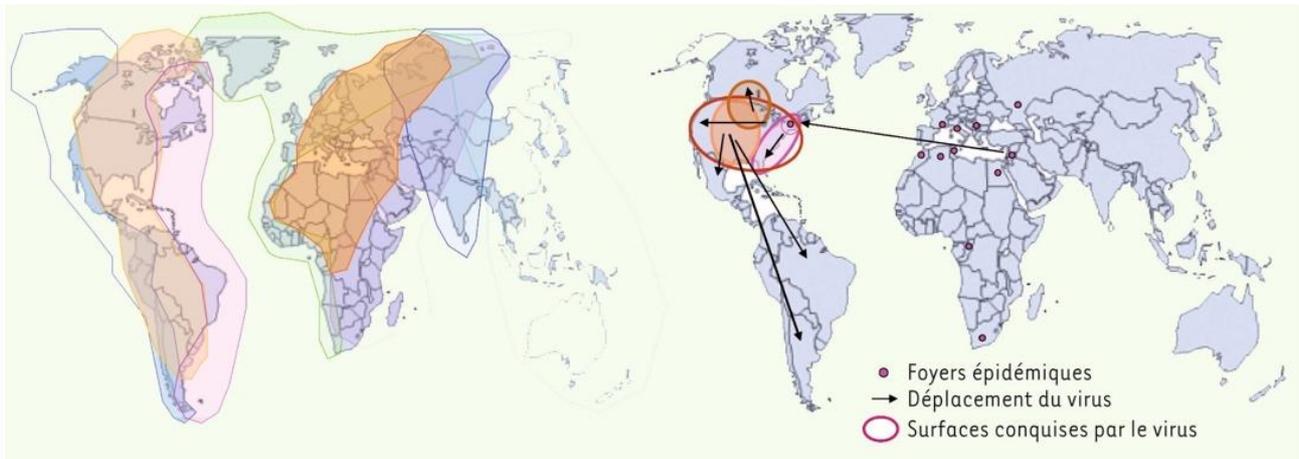


Figure 2. Courants migratoires à la surface du globe et influence sur la dispersion du VWN.

(A) chaque zone colorée représente un couloir migratoire. Les mouvements s'effectuent dans un axe Nord-Sud. (B) Répartition et déplacement des foyers épidémiques de West Nile de l'Ancien Monde vers le Nouveau Monde. Les principaux courants migratoires s'organisent selon un axe Amérique du Nord/Amérique du Sud, Europe/Afrique, Asie du Nord/Asie du Sud, Europe, Afrique/Amérique du Nord. (Lanteri et al. 2011)

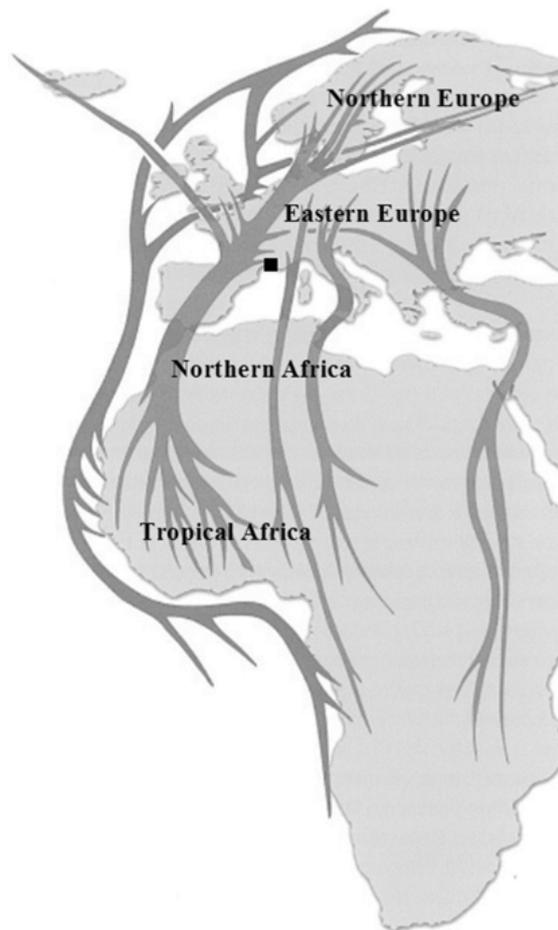


Figure 3. Courants migratoires des espèces aviaires entre l'Europe et l'Afrique.

Le carré noir correspond à la localisation de la Camargue. (Jourdain et al. 2007)

1.1.4. 2018 : une année exceptionnelle de circulation du VWN en Europe

La transmission du VWN en Europe est associée à la présence des moustiques *Cx. pipiens* et *Cx. modestus*. En France, le VWN a été détecté pour la première fois en 1962, puis aucune détection n'a été effectuée jusqu'en 2000 (Durand et al. 2002). L'année 2018 marque la plus grosse épidémie du VWN en Europe (Fig.4), avec 2083 cas humains autochtones confirmés et déclarés dont 181 décès, ainsi que 285 cas équins, selon le Centre Européen de Contrôle et de Prévention des maladies (ECDC). Ces données illustrent pour la première fois un nombre de cas enregistrés en Europe supérieur à celui enregistré aux USA. Toutefois, malgré la forte circulation du virus, le taux de létalité chez l'Homme est resté similaire aux années précédentes (9 % en 2018, 11 % en 2017 et 9 % en 2016). Aussi, l'augmentation des cas humains en France en 2018 est associée à l'apparition d'une souche de lignée 2 (Beck et al, 2020).

L'Europe a été de nouveau touchée par une forte épidémie en 2022, notamment en Italie avec un début de saison plus tôt qu'en 2018 (Barzon, Montarsi, et al. 2022). Avant Août 2022, la plupart des cas et morts identifiés à cause du VWN semblaient être en Italie (ECDC). Cette présence précoce du virus dans la zone pourrait être expliquée par un climat plus chaud qu'habituellement. (Lourenço et al. 2022). Le 21 Août 2022, un total de 222 cas humains étaient confirmés par des analyses moléculaires dont 103 présentant des signes de fièvre et 109 des signes de maladie neuroinvasive. La plupart des infections étaient dues à un virus du lignée 1 (138 cas) tandis que 63 cas étaient dus à un virus de lignée 2 (Barzon et al. 2022).

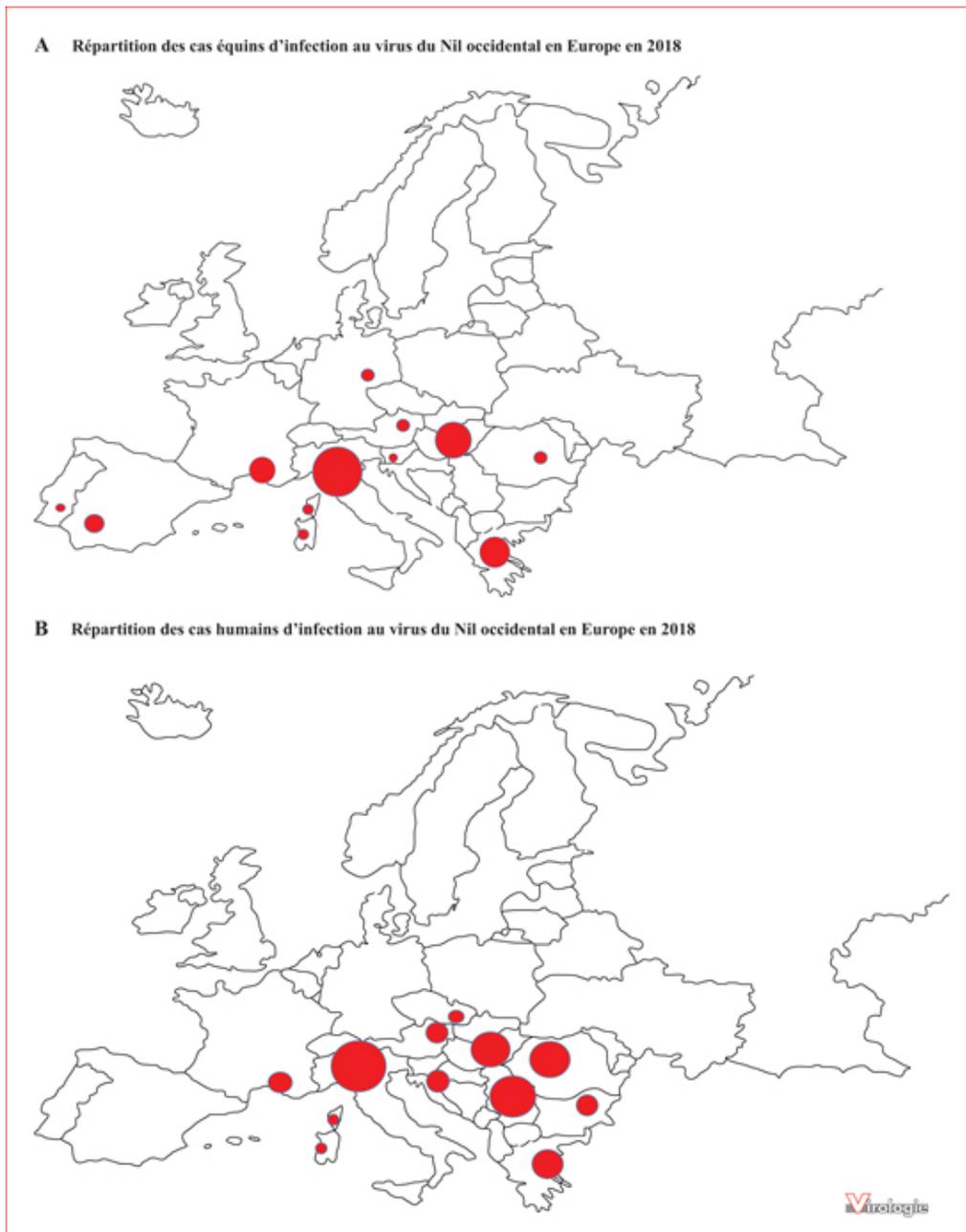


Figure 4. Répartition des cas équins (A) et humains (B) en Europe en 2018.

Les cercles rouges correspondent aux zones présentant des cas équins (A) ou humains (B). La taille du cercle est dépendante du nombre de cas identifiés. (Martin and Simonin 2019)

1.2. Classification phylogénétique

1.2.1. Phylogénie des différentes lignées du virus West Nile

Le VWN est un arbovirus (transmission par des arthropodes, en l'occurrence des moustiques) appartenant à la famille des *Flaviridae*, genre *flavivirus*. C'est un virus du groupe IV d'après la classification de Baltimore, c'est-à-dire qu'il possède un génome ARN simple brin à polarité positive. Il est classé en huit lignées (Pérez-Ramírez et al. 2017). Les lignées 1 et 2 regroupent les souches les plus pathogènes et les plus largement disséminées sur le globe. La distribution du VWN de lignée 1 s'étend en Amérique, Afrique, Europe, Inde, au Moyen-Orient, en Russie et en Australie avec des épidémies chez l'Homme essentiellement en Europe et en Amérique du Nord (Zeller and Schuffenecker 2004). La lignée 1 est scindée en trois clades détaillés plus tard dans le manuscrit.

Historiquement, la lignée 2 est endémique de l'Afrique sub-saharienne et à Madagascar, associée à des états fébriles chez l'homme, en absence d'atteinte du système nerveux central (Burt et al. 2002). Il est possible que les VWN de lignée 2 aient été originaires d'Afrique et se soient introduits en Europe plus récemment notamment avec des cas chez les oiseaux et chez l'Homme (Erdélyi et al. 2007). La lignée 3 a principalement été isolée à partir de moustiques de République Tchèque, en 1997 et 1999, avec des infections rapportées uniquement chez le moustique ou des cultures de cellules de moustique (Bakonyi et al. 2005). La lignée 4 regroupe des virus isolés en Russie depuis 1988 (Lvov et al. 2004). La lignée 5 correspond à l'ancien clade 1c avec des isolats d'Inde de 1955 à aujourd'hui (Bondre et al. 2007) (Fig.6).

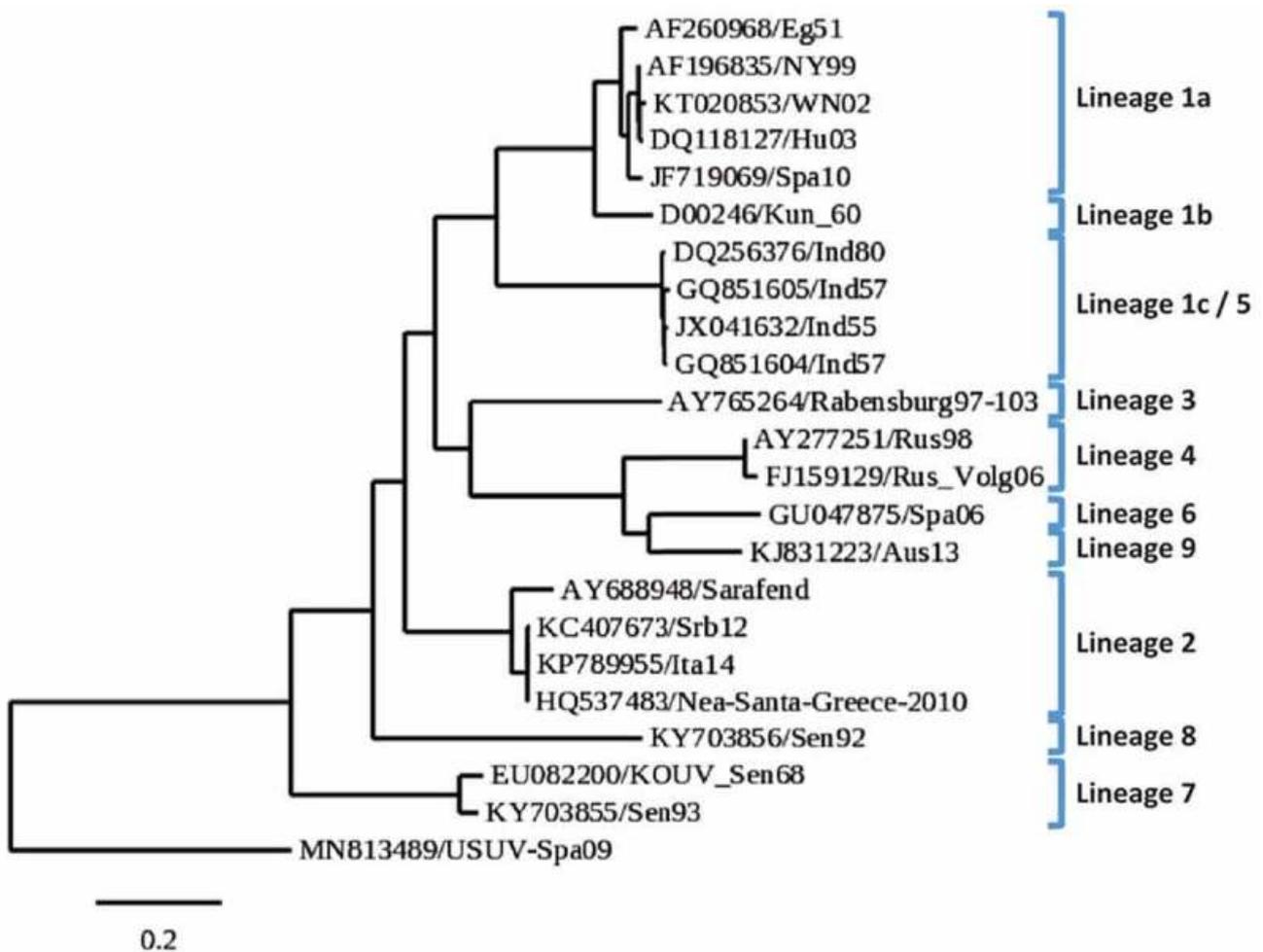


Figure 5. Arbre phylogénétique des principales séquences complètes de génomes des principales lignées du VWN. (Saiz et al. 2021)

D'autres lignées sont également décrites comme la lignée 6 retrouvée chez des moustiques *Culex pipiens* dans le sud de l'Espagne (Vazquez et al. 2010), la lignée 7 retrouvée en Afrique uniquement, sur les tiques et les rongeurs du Sénégal (Fall et al. 2014), la lignée 8 correspondant au virus Koutango aujourd'hui considéré comme un virus à part et enfin la lignée 9 décrite en Europe et en Autriche chez les moustiques *Uranotaenia unguiculata* (Pachler et al. 2014).

Enfin, les lignées 1 & 2, fortement pathogènes, se retrouvent largement distribuées en Afrique, le berceau du VWN, renforçant l'hypothèse que ces deux lignées hautement virulentes aient vu le jour en Afrique avant de se disséminer à la surface du globe (Fig.6). La lignée 2 est également largement présente en Europe notamment depuis 2004 (Bakonyi et al. 2013) (Papa et al. 2011) (Ziegler et al. 2019) (Rudolf et al. 2017) (Calistri et al. 2010) (Hernández-Triana et al. 2014).

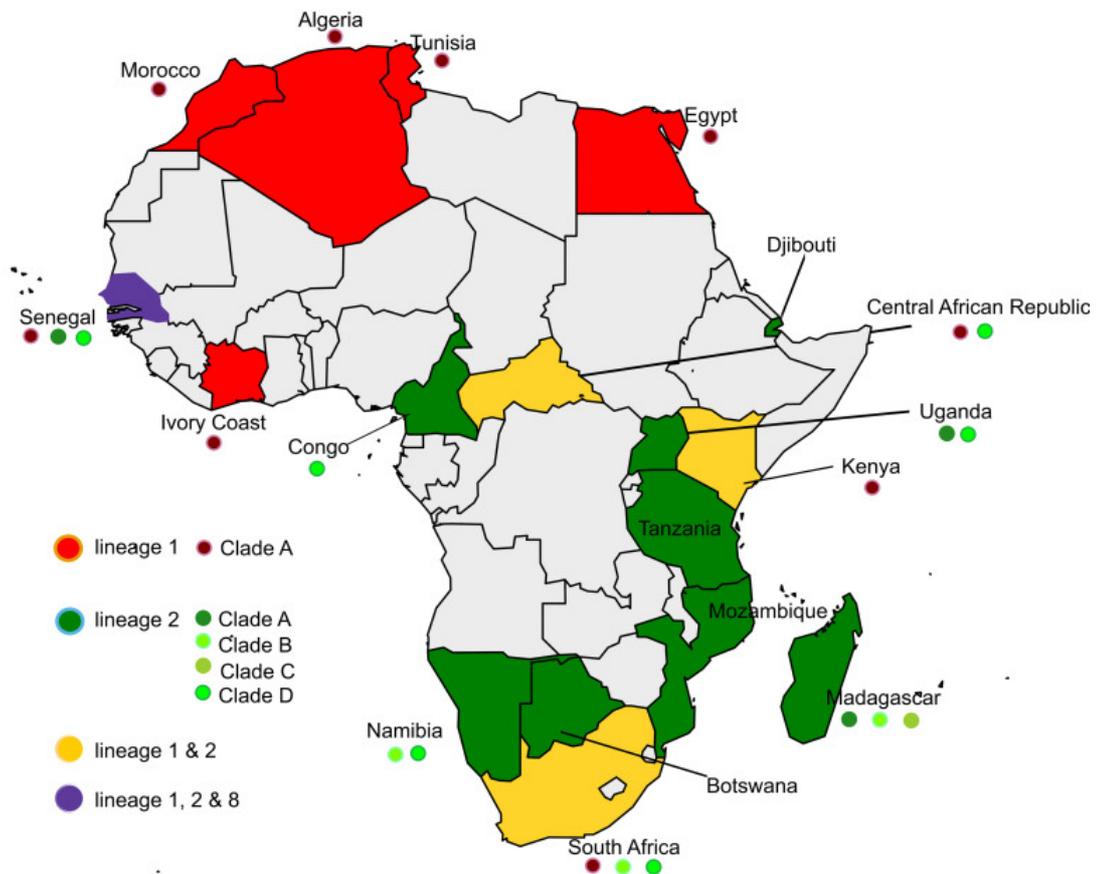


Figure 6. Lignées du VWN reportées pour 17 pays africains.

(Mencattelli et al. 2022)

1.2.2. La lignée 1 : une souche hautement pathogène

La lignée 1 du VWN est divisée en trois clades, les clades 1a, 1b et 1c (Fig.7). Le clade 1a rassemble les isolats d’Afrique, d’Europe, du Moyen-Orient, de la Russie et de l’Amérique ; il se sub-divise en 6 clusters. Le cluster 4 correspond aux souches américaines et israéliennes isolées entre 1997 et 2000, et constitue un groupe hautement pathogène entraînant une forte mortalité aviaire. Les souches nord-américaines et israéliennes sont très proches génétiquement avec 99,7% d’homologie de séquence (Monini et al. 2010). La possibilité que la souche Israël 1998 soit un précurseur de la souche retrouvée à New-York en 1999 est une observation controversée par des analyses phylogénétiques menées par May et al. en 2011 (May et al. 2011).

Le clade 1b regroupe les isolats du virus Kunjin et certains sous-types australiens et enfin le clade 1c se compose d’isolats provenant d’Inde uniquement.

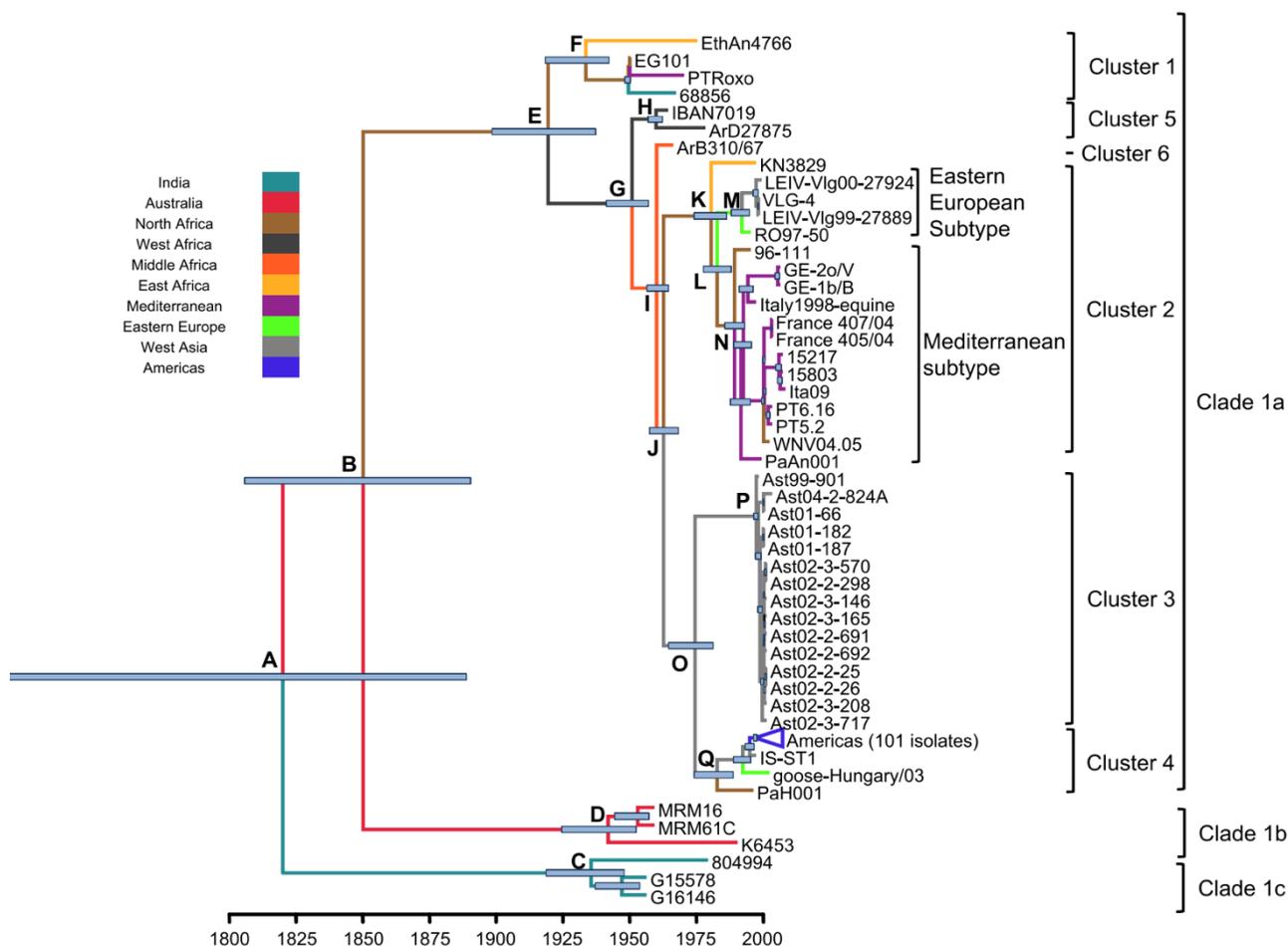


Figure 7. Arbre phylogénétique de la lignée 1 du VWN.

Les couleurs représentent l'origine géographique. India : Inde, Australia : Australie, North Africa : Afrique du Nord, West Africa : Afrique de l'Ouest, East Africa : Afrique de l'Est, Mediterranean : Méditerranée, Eastern Europe : Europe de l'Est, West Asia : Asie occidentale, Americas : Amériques du Nord et du Sud, Eastern European Subtype : sous-type Europe de l'Est, Mediterranean subtype : sous-type méditerranéen, Cluster : groupe. (May et al. 2011)

La lignée 1 est largement représentée à la surface du globe (Fig.8), notamment le clade 1a (représenté en nuances de bleu dans la Fig.8). A l'origine, la circulation du virus était endémique en Afrique tandis que l'apparition du virus en Europe relevait d'introduction épidémiques, avec pour origine un foyer initial en Afrique (May et al. 2011). Toutefois, depuis quelques années, une circulation endémique du virus s'est révélée en Europe, avec maintien hivernal du virus (Barzon et al. 2013).

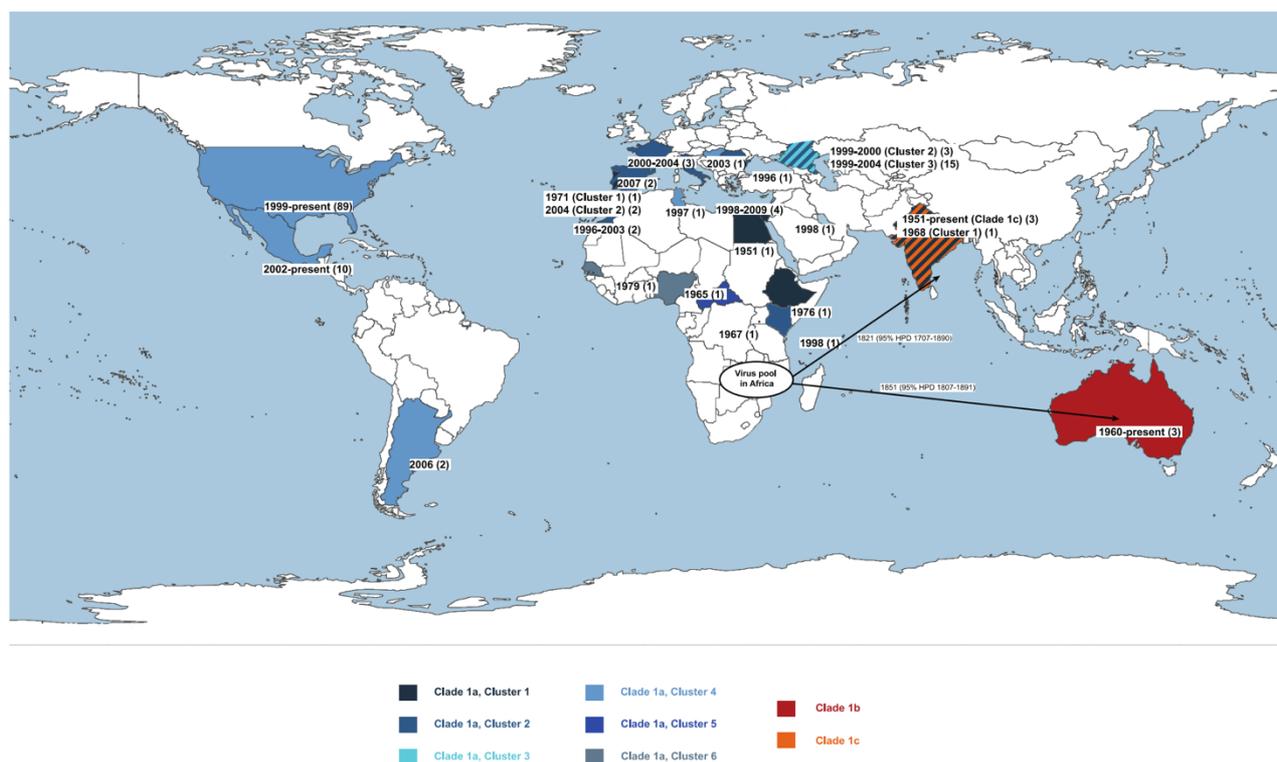


Figure 8. Distribution mondiale des VWN de lignée 1 dont les séquences complètes sont connues.

Le nombre d'isolats présents dans chaque pays est mentionné entre parenthèses. Les dates d'identification de la circulation sont mentionnées entre parenthèses. Pour certains virus, les mouvements ayant permis la dissémination sont représentés. Ces données datent de 2011. (May et al. 2011)

1.3. Cycle de transmission

1.3.1. Les cycles de transmission enzootique et épizootique

Le VWN se transmet dans un cycle enzootique entre les oiseaux, par le biais des moustiques vecteurs, et dans de rares cas dans un cycle épizootique pour lequel une trentaine d'espèces de mammifères dont les Hommes ou les chevaux, peuvent être infectés par le VWN. Ces hôtes mammifères sont le plus souvent des hôtes accidentels, cul-de-sac épidémiologique de l'infection, qui restent révélateurs d'un haut niveau de circulation du virus. Seuls l'Homme et le cheval peuvent cependant développer des symptômes suite à l'infection.

Au sein des espèces d'oiseaux, il est possible d'observer une transmission oro-fécale, moins fréquente que l'infection par piqûre de moustiques infectés. Chez les moustiques *Culex*, la transmission du virus peut se faire de façon verticale (Fig.9). Chez l'Homme, des cas de transmission inter-individus ont été observés de la mère

vers l'enfant par le placenta ou lors de l'allaitement, lors de transplantation d'organes ou par transfusion sanguine.

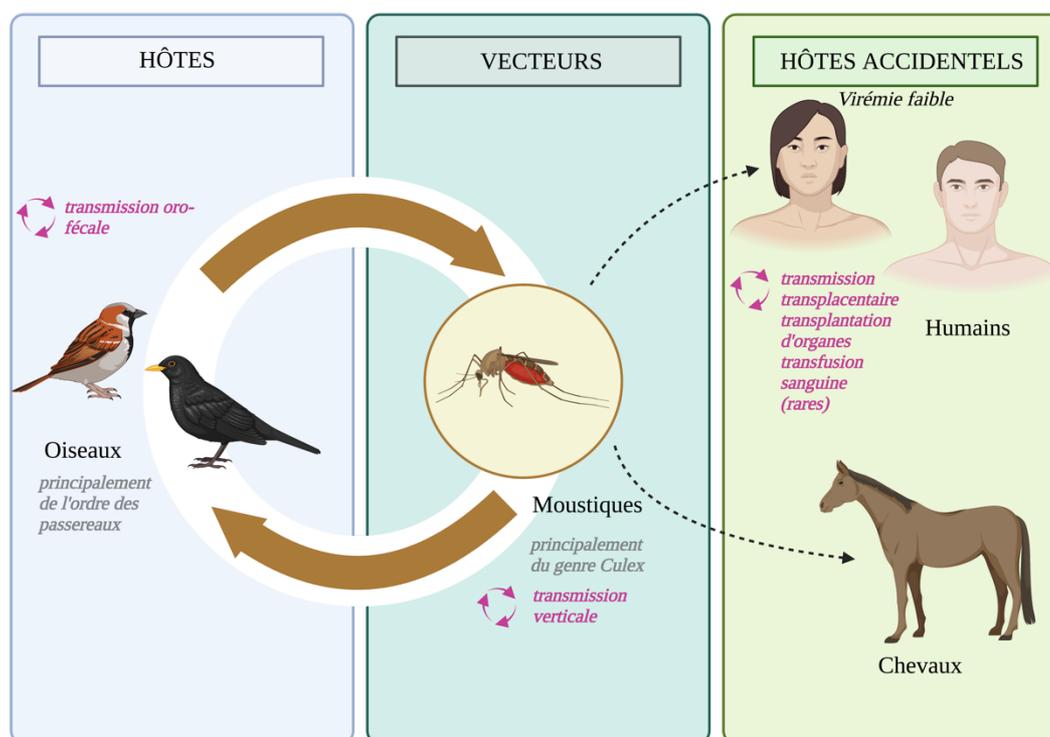


Figure 9. Cycle de transmission du VWN.

Dans la nature, le VWN se transmet dans un cycle enzootique faisant intervenir les oiseaux comme hôtes et les moustiques, principalement du genre *Culex* comme vecteurs. Une possible transmission accidentelle peut être observée chez les Hommes et chez les chevaux. Toutefois ces derniers développent une virémie faible ne permettant pas à un vecteur de s'infecter après la prise d'un repas sanguin sur ces hôtes, c'est pourquoi ils sont qualifiés de « cul-de-sac » épidémiologique. Réalisation : Lise Fiacre d'après <https://eu.biogents.com/west-nile/>, réalisé via BioRender.

1.3.2. Voies de transmission chez l'Homme

Bien que le cycle naturel de VWN soit établi entre les oiseaux et les moustiques, il est démontré que ces mêmes moustiques peuvent également piquer des hôtes mammifères et les infecter. Le virus peut notamment se transmettre chez le cheval ou chez l'Homme et se répliquer. Cependant, ces deux espèces ne développent pas une virémie suffisante (10^5 PFU/mL) (Vaughan et al. 2022) c'est pourquoi on les caractérise de « cul-de-sac » épidémiologiques (Bunning et al. 2002), puisqu'ils ne permettent pas à un moustique naïf de s'infecter en se gorgeant sur eux. Il est important de noter qu'une virémie suffisante chez l'hôte pour permettre l'infection d'un moustique est une variable qui est influencée notamment par l'espèce de moustique considérée mais également par l'hôte considéré. En effet, Vaughan *et al.* ont montré en 2022 que pour permettre l'infection d'un *Culex pipiens*, il est nécessaire que l'hôte aviaire présente une virémie à minima de $5 \log_{10}$ PFU/mL que ce soit chez le Merle d'Amérique ou bien chez le Quiscale bronzé, et que plus cette virémie augmente, plus la probabilité

d'infection du *Culex pipiens* prenant un repas sanguin sur cet hôte, est élevée. Aussi, lorsque la virémie du Merle d'Amérique atteint $8 \log_{10}$ PFU/mL, alors la totalité des *Culex pipiens* ayant pris un repas sanguin sur cet hôte étaient infectés. (Vaughan et al. 2022).

Il existe également d'autres modes de transmission qui ont été identifiés chez l'Homme, notamment la transmission lors de la **transfusion sanguine** (premier cas identifié aux Etats-Unis en 2002 (Pealer et al. 2003) ou bien lors de **transplantation d'organes** (premiers cas identifiés en 2002) (Nett et al. 2012 ; Winston et al. 2014). Chez la femme enceinte, la transmission de la mère vers l'enfant peut se faire avant la naissance par **passage transplacentaire** (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2002), ou très rarement après l'accouchement lors de l'**allaitement**. La première identification d'une transmission virale par le lait maternel a été faite en 1946, avec le virus de la tumeur mammaire chez la souris (Andervont 1946). Depuis, le passage de virus de la mère vers l'enfant dans le lait maternel a été mis en évidence pour d'autres virus, avec des premières suspicions en 2002 pour le VWN (Hinckley et al. 2007). Cette suspicion fait suite, en 2002, à une transfusion sanguine chez une patiente. Des analyses montrent *a posteriori* que le donneur était positif au VWN. Treize jours après la transfusion, la patiente montrait une présence d'IgM dans le liquide céphalo-rachidien. Seize jours après, la présence du génome viral a été détecté dans le lait maternel. Des analyses ont également montré la présence d'IgM chez l'enfant nourri par ce lait maternel. La présence de virus dans le lait maternel a également été montrée pour d'autres virus, comme CHIKV (Campos et al. 2017), DENV (Arragain et al. 2017) ou ZIKV (Sotelo et al. 2017).

1.4. Le génome viral

Le génome viral du VWN est un ARN simple brin de polarité positive (+ssRNA) d'environ 11kb, qui code pour une seule polyprotéine (un seul cadre ouvert de lecture), entourée de deux régions non-codantes ; une région 5'UTR d'environ 100 nucléotides et une région 3'UTR faisant de 400 à 700 nucléotides. Ces régions non-codantes renferment des structures secondaires comme des tiges-boucles (stem-loop, SL), des épingles à cheveux (hairpin, HP), des séquences de cyclisation (cyclization sequence, CS) et des pseudo-nœuds (pseudoknots, PK). Ces séquences sont conservées entre les flavivirus, malgré quelques mutations ponctuelles, et interagissent entre elles pour permettre les différentes étapes du cycle de réplication viral, comme la réplication, la transcription ou la traduction (Brinton 2013).

Le génome du VWN contient une coiffe méthylée en 5' (m(7)GpppAm), permettant une bonne infectiosité et ayant un rôle dans la protection de l'ARN viral, dans la facilitation de la traduction ainsi que dans l'évasion de réponse immunitaire chez l'hôte grâce à la méthylation 2'O. En effet, la coiffe est méthylée à deux positions, la guanine N-7 et le ribose 2'OH de la première adénine transcrite (Brinton 2013). La méthylation 2'O augmente la virulence, notamment en permettant l'échappement à certains mécanismes de défense cellulaire. En effet,

elle permet au virus d'échapper à la réponse immunitaire innée en échappant à la suppression médiée par les protéines IFIT. Les protéines IFIT sont des protéines antivirales, induites par les IFN, comportant des répétitions de tétratricopeptides, habituellement engagées dans la régulation de la traduction des protéines (Daffis et al. 2010).

La région 3'UTR ne dispose pas de queue poly-A, mais se termine par les nucléotides CU_{OH} jouant un rôle de déterminant moléculaire de virulence du VWN (Bidet and Garcia-Blanco 2018). La région 3'UTR et ses structures secondaires sont essentielles pour la réplication virale et jouent un rôle dans la virulence de nombreux flavivirus, notamment le VWN (Davis et al. 2007). La région 3'UTR comporte notamment des structures en tige-boucle (séquence de cyclisation) qui sont importantes afin d'assurer la cyclisation du génome en interagissant avec la séquence de cyclisation de la 5'UTR. Les différentes séquences conservées présentes au niveau de la région 3'UTR sont impliquées dans l'activité de la polymérase (You and Padmanabhan 1999).

La polyprotéine est clivée en trois protéines structurales : C (capside), prM/M (pré-membrane/membrane) & E (enveloppe) et sept protéines non-structurales : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B & NS5 (Fig.10).

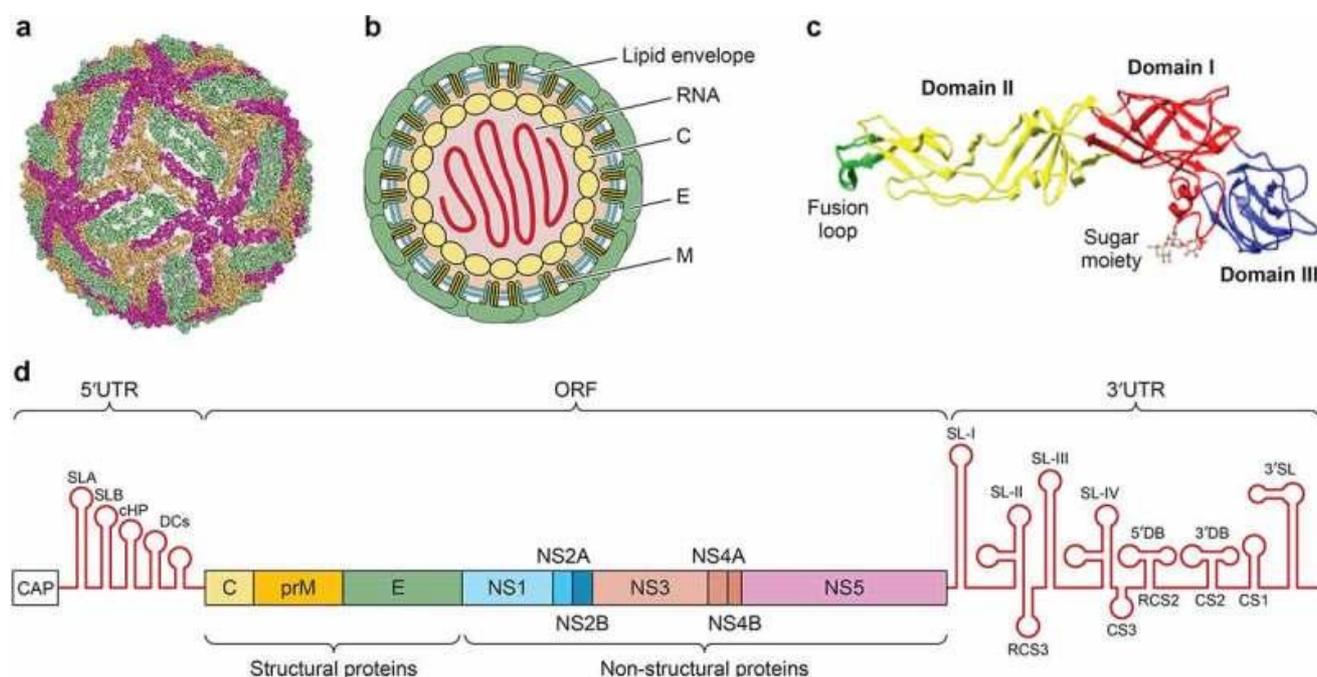


Figure 10. Structure et organisation du génome du VWN.

a) Représentation de la surface de la particule virale. b) Représentation schématique de la particule. c) Structure cristallographique du monomère de la glycoprotéine E. d) Organisation du génome WN. (Saiz et al. 2021)

1.4.1. Les protéines structurales

La **protéine C** est impliquée dans la formation de la nucléocapside et joue un rôle essentiel dans l'assemblage viral et la réplication (Schrauf et al. 2009). Cette protéine joue un rôle dans l'induction de l'apoptose (Yang et al. 2008), et le dérèglement de la barrière hémato-encéphalique (BHE), ce qui favorise la dissémination du virus (Medigeschi et al. 2009). La **glycoprotéine prM** est un précurseur de la protéine M qui est transloquée dans le réticulum endoplasmique grâce au domaine hydrophobique C-terminal de la protéine C. La partie N-terminale de la protéine prM contient un site de N-glycosylation jouant un rôle dans l'infectiosité (Hanna et al. 2005). La protéine prM joue également un rôle essentiel dans le réarrangement structural de la protéine E (Heinz et al. 1994). La **protéine E** est également une protéine transmembranaire glycosylée dont le rôle principal est la liaison au récepteur cellulaire, ainsi que la fusion à la membrane des vésicules. C'est aussi la protéine la plus immunogénique (Mukhopadhyay et al. 2005). La glycosylation de la protéine E, notamment au niveau des résidus 154 à 156, joue un rôle dans la transmission et dans la neuroinvasion (Beasley et al. 2005). C'est une protéine composée de trois domaines, DI, DII et DIII, chacun ayant un rôle différent, le DII étant impliqué dans la fusion avec la membrane cellulaire quand le DIII est composé de nombreux épitopes et assure la liaison aux récepteurs (Fields Virology, 6th ed.), et enfin le DI dont le rôle est peu décrit, est composé de 8 feuillets beta.

1.4.2. Les protéines non-structurales (NS)

La **protéine NS1** est largement conservée chez les différents flavivirus. Elle possède trois sites de N-glycosylation et peut exister sous forme de monomère, de dimère (protéine liée à la membrane) ou d'héxamère (protéine sécrétée). Elle joue un rôle dans la réplication, la virulence, l'immunomodulation et la pathogénèse (Rastogi, Sharma, and Singh 2016). Sa forme mature est un homodimère transporté à la surface de la cellule, qui diminue l'activité du système du complément (Chung et al. 2006). En effet, l'interaction de la protéine NS1 est connue avec plusieurs protéines du complément, notamment C3, C4, C5, le facteur D ou le facteur H. Les protéines NS1 et NS1 soluble recrutent et interagissent avec le facteur H, entraînant la dégradation de C3b, et diminuant la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9 dans l'environnement des cellules infectées. Le tout conduit à une diminution de la réponse du complément par les cellules infectées et minimise la réponse immunitaire des cellules infectées (Chung et al. 2006).

La **protéine NS2A** est une protéine hydrophobe impliquée dans les réarrangements membranaires intracellulaires et l'assemblage des virions (Leung et al. 2008). NS2A se lie au complexe de réplication, ainsi qu'aux protéines NS3 et NS5 (Mackenzie et al. 1998). Cette protéine va également agir sur la réponse immunitaire de l'hôte notamment au niveau de la voie de l'IFN de type I (Liu et al. 2006). La **protéine NS2B** agit comme cofacteur de la protéine NS3 (Brinton 2013).

L'**hélicase/protéase NS3** possède une activité protéase en son domaine N-terminal qui est active lorsque la protéine NS3 est liée au co-facteur NS2B (H. Zhou, Singh, and Kim 2006). Par son activité protéasique, ce complexe va couper les jonctions entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K et NS4B/NS5. L'hélicase/protéase NS3 va également cliver la protéine C afin de l'incorporer dans les virions nouvellement formés (Yamshchikov and Compans 1993). La partie C-terminale possède une activité RNA triphosphatase impliquée dans la formation de la coiffe en 5' du génome, ainsi qu'une activité hélicase permettant la synthèse et la réplication de l'ARN viral (Bollati et al. 2010).

La **protéine NS4A** joue un rôle dans le réarrangement membranaire et dans l'inhibition de la voie de l'IFN (Muñoz-Jordan et al. 2003). Elle régule également l'activité ATPase de l'hélicase NS3 (Shiryaev et al. 2009). La **protéine NS4B** joue un rôle majeur dans l'inhibition de la voie de l'IFN (Evans and Seeger 2007) ainsi que dans la réplication virale (Wicker et al. 2012).

Enfin, la **polymérase NS5** est la plus longue et la plus conservée des protéines non-structurales. Elle comporte une N-terminale méthyltransférase (MTase) ainsi qu'une C-terminale ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (Klema et al. 2016). Elle joue un rôle essentiel dans la réplication virale et permet notamment de catalyser la méthylation de la guanine N-7 ainsi que la méthylation sur le site 2'O afin de générer la coiffe en 5' du génome. Elle peut agir comme un antagoniste de la voie de l'IFN chez l'hôte (Brinton 2013).

1.4.3. Modifications génomiques au cours du cycle de transmission

Le VWN s'est disséminé sur tous les continents (sauf l'Antarctique) et durant sa transmission à travers le monde, son génome s'est modifié au fil des réplifications dans les différents hôtes mais également dans les vecteurs. Il a acquis une mutation sur la protéine de l'enveloppe (E-I154N) (Moudy, Zhang, and Shi 2009), qui lui permet d'avoir une compétence vectorielle accrue chez le moustique *Culex pipiens* et *Culex tarsalis* *Coquillett*. Ses trajectoires évolutives sont influencées par des pressions de sélection et des effets stochastiques (Brault 2009). Des études ont montré que les pressions de sélection sont oiseaux-spécifiques et que la pression de sélection est plus grande au sein d'une même espèce d'oiseaux que chez une même espèce de moustiques. Concrètement, la diversité virale semble diminuer chez les oiseaux tandis qu'elle augmente lorsque le virus se réplique dans le vecteur moustique (Fig.11). Il se pourrait donc que la réponse immunitaire chez les oiseaux impose une pression de sélection au VWN. Toutefois, des études plus récentes réalisées sur des oiseaux permettant une bonne réplication du virus, tendent à montrer que la diversité génétique pourrait également se développer chez ces hôtes aviaires (Dridi et al. 2015).

Les changements dans la transmission et le génome du VWN sont également dépendants de facteurs écologiques tels que la saisonnalité. En effet, durant l'hiver, la transmission du VWN s'effectue principalement par transmission verticale chez les moustiques, ce qui agit comme un goulot d'étranglement limitant la quantité

de virus. Le maintien du virus est également possible via des infections chroniques chez l'oiseau (Bakonyi et al. 2016) (Reisen et al. 2013).

En 2003, une souche naturellement atténuée est isolée pour la première fois. Une étude montre que la réplication de ce virus sur un tapis de cellules Vero entraîne l'apparition de petites plages de lyse, contrairement à la souche hautement virulente NY-99. De plus, une étude *in vivo* de la virulence sur un modèle murin renforce cette observation (Davis et al. 2004).

Certaines mutations, comme la mutation au niveau de la Thréonine en position 249 (T249P) de la protéine NS3, agissent comme des déterminants moléculaires de virogénèse et de virulence puisqu'ils permettent une meilleure réplication dans l'hôte aviaire (Brault et al. 2007).

Enfin, durant son expansion à travers le continent américain, un nouveau génotype a vu le jour, la souche « WN02 » qui s'est rapidement imposée comme la souche majoritaire dans cette partie du globe. La séquence consensus de la souche WN02 diffère de la souche NY-99 par trois changements de nucléotides : U en C en position 14442 du gène E, un changement du nucléotide C en U en position 2466 du gène E et enfin un changement du nucléotide C en U en position 9352 dans le gène NS5. Seul le changement U14442C conduit à une mutation non-synonyme, entraînant le changement d'un acide aminé valine vers un acide aminé alanine en position 159 de la protéine E (Davis et al. 2005) (Ebel et al. 2004). L'ensemble de ces mutations contribue à réduire la période extrinsèque d'incubation chez le moustique et favorise la transmission du virus par le moustique (Moudy, Meola, and Morin 2007). La notion de période extrinsèque d'incubation est détaillée dans la section 2.5 de l'introduction de ce manuscrit.

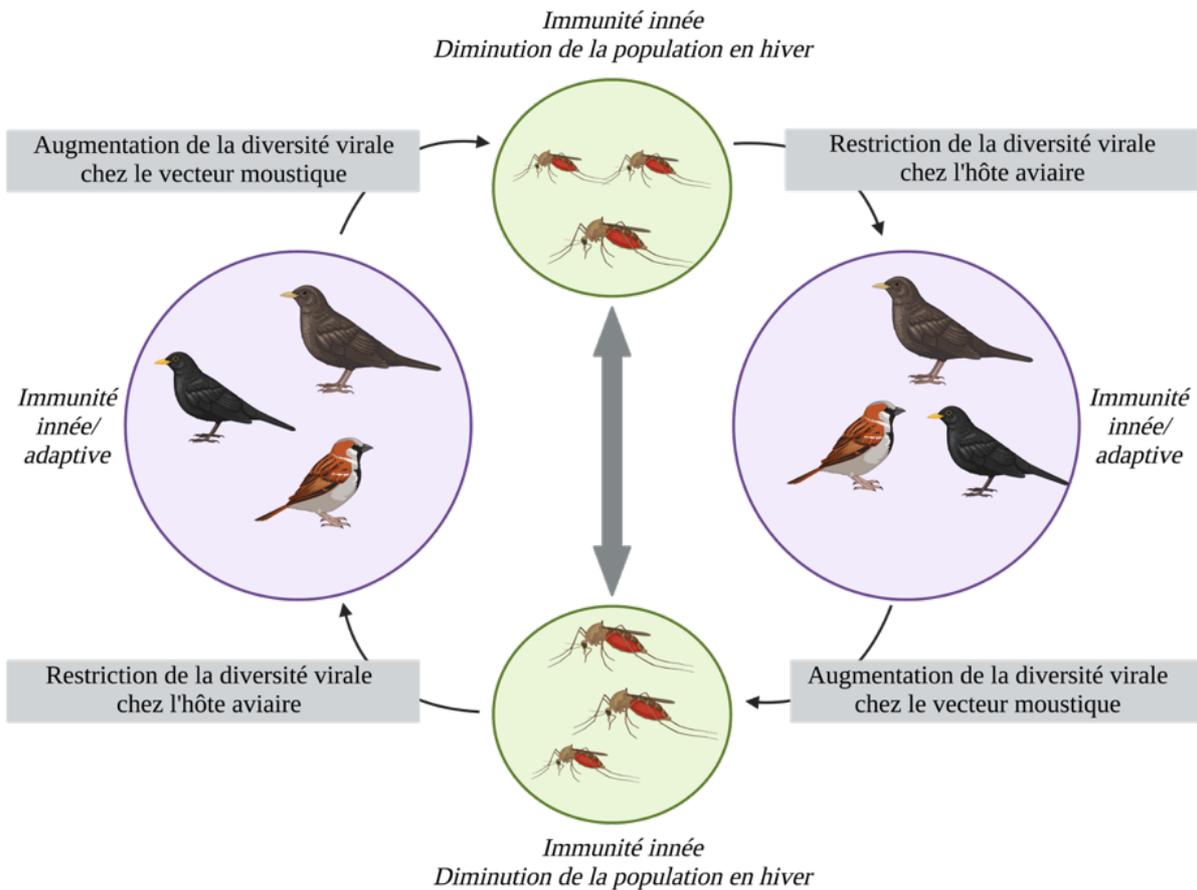


Figure 11. Transmission du VWN et critères sélectifs modifiant le génome au fil des cycles de transmission.

Réalisation : Lise Fiacre d'après (Duggal et al. 2019), réalisé via BioRender.

1.5. Cycle de réplication chez le mammifère

Le VWN peut se répliquer dans différents types cellulaires, que ce soit des cellules de mammifère, des cellules aviaires ou encore des cellules d'insecte. Par conséquent, il peut se fixer à différents types de récepteurs comme le récepteur DC-SIGNR (van Leur et al. 2021) chez les mammifères ou bien le récepteur mosGCTL-1 chez les moustiques (Bakhshi et al. 2021). Il peut également y avoir une interaction entre l'enveloppe lipidique du virus et les protéines TIM et TAM (Wang et al. 2017) de la famille des récepteurs phosphatidylsérine.

Une fois que la particule virale est fixée sur son récepteur, elle est internalisée via une endocytose clathrine-dépendante. Ensuite, le virus est transporté à l'intérieur de la cellule dans un endosome par un système actine/microtubules ainsi que sous l'action de GTPase Rab5 (Krishnan et al. 2007). Sa sortie de l'endosome s'effectue sous l'action d'un changement de pH à l'intérieur de l'endosome. Ce changement de pH s'accompagne de changements conformationnels dans la protéine E ce qui induit la fusion de l'enveloppe virale avec l'endosome permettant le relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme (van der Schaar et al. 2008)

puis la décapsidation et le relargage de l'ARN viral dans le cytoplasme. À la suite de cela, le processus de réplication peut être enclenché.

Tout d'abord, l'ARN viral recrute la sous-unité ribosomale 40S et d'autres composants cellulaires pour initier la traduction coiffe-dépendante au niveau du codon initiateur AUG, au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Cela permet la traduction de la polyprotéine qui se retrouve dans le cytoplasme et la production des différentes protéines virales après clivages par les protéases virale NS3(-NS2B) et cellulaires. La réplication virale s'effectue dans les invaginations du RE (Gillespie et al. 2010). Elle nécessite un brin d'ARN de polarité négative qui va servir de modèle pour générer des génomes de polarité positive (Brinton 2013). La réplication de l'ARN ainsi que l'accumulation de protéines NS au niveau du réticulum endoplasmique (RE) produit un stress qui est responsable de l'apoptose dans les cellules infectées (Parquet et al. 2001). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée déclenchée par la cellule en réponse à un signal. C'est une réponse efficace pour contrer la réplication virale et limiter sa transmission aux autres cellules. Cette réponse est cependant responsable de la pathophysiologie due au virus (Marianneau et al. 1997) et peut également faciliter la dissémination virale, en limitant l'induction de la réponse inflammatoire et immunitaire. Enfin, chez certains flavivirus, comme le virus Zika, l'apoptose est un mécanisme qui peut être contrôlé par le virus, en maintenant un état anti-apoptotique en agissant notamment sur le régulateur cellulaire anti-apoptotique Bcl-2 (Thèse, Turpin, 2021).

L'assemblage du virus immature a lieu dans la lumière du RE, à la suite de quoi la particule virale s'oriente vers l'appareil de Golgi afin d'y subir les maturation nécessaires (prM clivée par une protéase de type furine) avant le relargage de la particule virale dans le milieu extracellulaire (Fig.12 et 13).

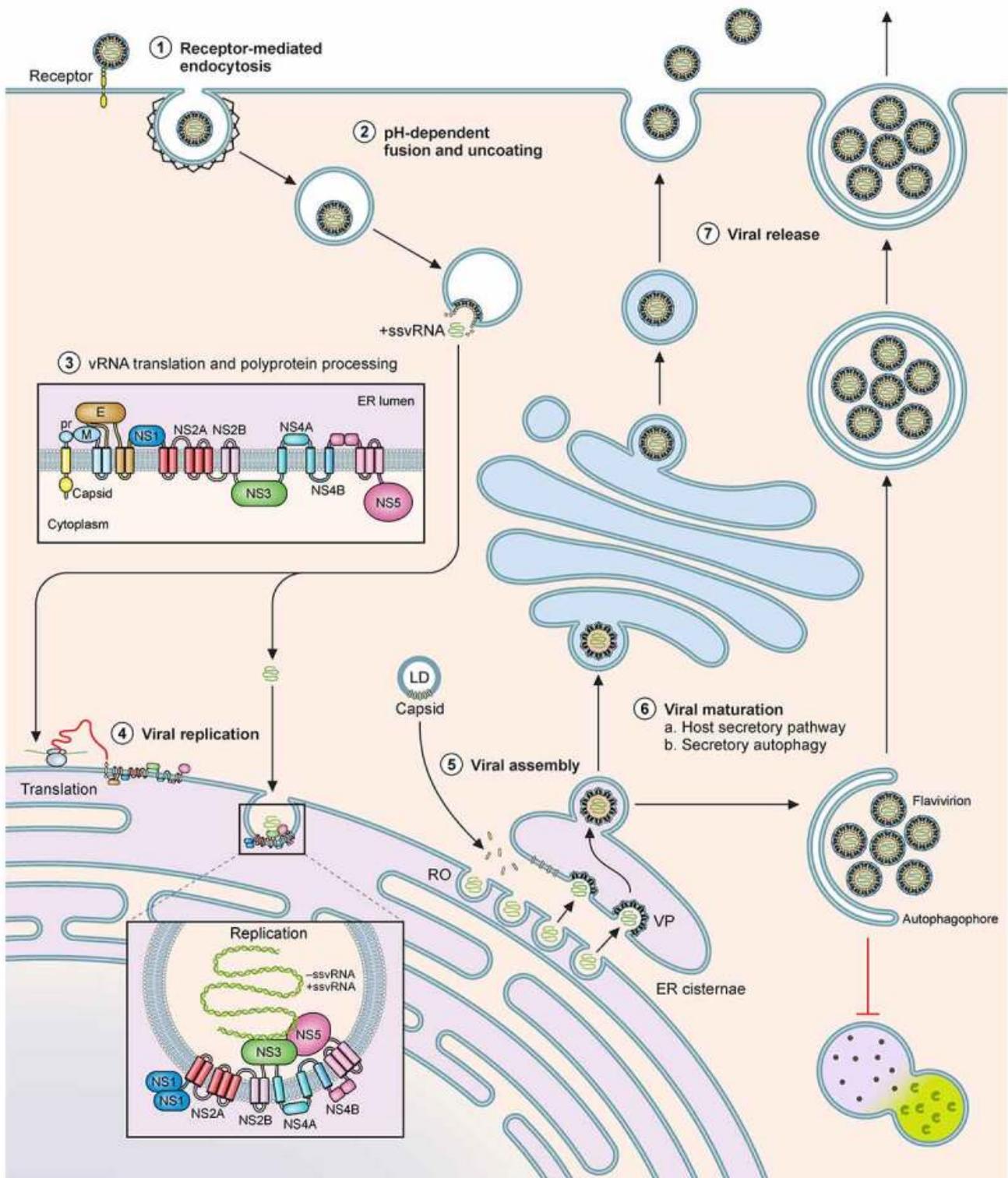


Figure 12. Cycle de réplication du VWN.

Les principales étapes sont la (1) fixation au récepteur cellulaire, suivi de (2) l'internalisation dans l'endosome de l'hôte. (3) La membrane virale fusionne avec la membrane de l'endosome à la suite d'une acidification du pH au sein de l'endosome. (4) Décapsidation de la particule virale. (5) Recrutement de la sous-unité ribosomique 40S permettant d'initier la traduction de la polyprotéine au niveau du réticulum endoplasmique. (6) Réplication et assemblage de la particule virale immature dans le RE. (7) Maturation de la particule virale au niveau de l'appareil de Golgi par la voie de sécrétion. (8) Relargage du virion mature. (van Leur et al. 2021)

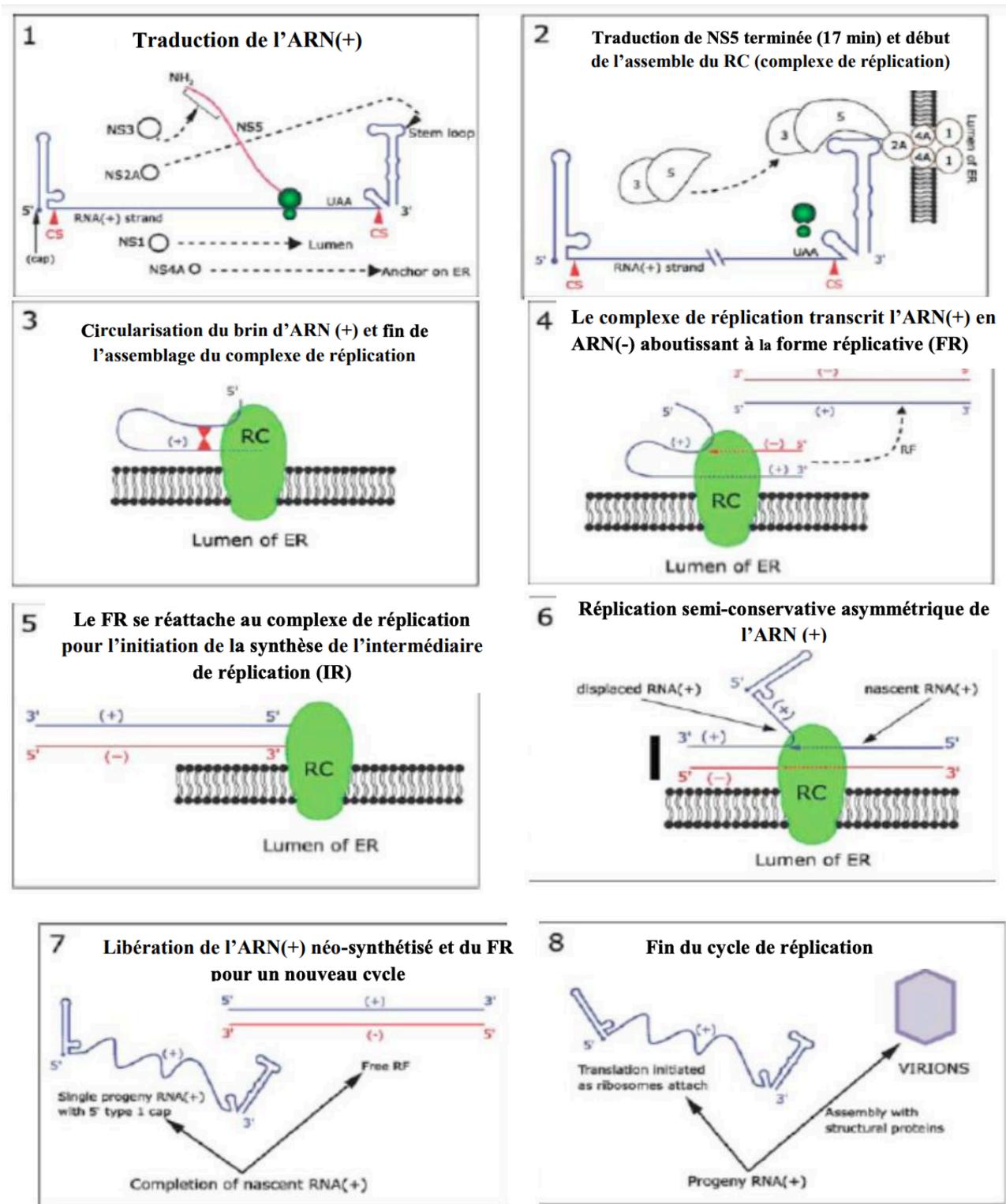


Figure 13. Traduction, réplication et assemblage des particules virales.

(1) L'ARN (+) est traduit. (2) Une fois la NS5 traduite, le complexe de réplication peut s'assembler. Le complexe de réplication est formé de NS1, NS2A, NS3, NS4A et NS5. (3) Circularisation du brin d'ARN (+) et fin de l'assemblage du complexe de réplication. (4) Le complexe de réplication va transcrire l'ARN (+) en ARN (-), donnant lieu à la forme répliquative. (5) La forme répliquative se détache du complexe de réplication. (6) Réplication de l'ARN (+). (7) Libération de l'ARN (+) néo-synthétisé et de la forme répliquative pour un nouveau cycle. (8) Formation de virions. D'après la Thèse de Céline Bahuon.

1.6. Pathogenèse virale

1.6.1. Infection et dissémination

La dissémination chez le mammifère se fait en quatre grandes étapes essentielles (Fig. 14), (1) une phase précoce avec une répllication au niveau des différentes cellules immunitaires de la peau notamment les cellules de Langerhans, (2) puis une dissémination vers les nœuds lymphatiques notamment par les cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques, (3) puis vers la rate et (4) enfin dans les cas les plus graves, une atteinte du cerveau conduisant à l'infection des cellules neurales, rendue possible après passage de la BHE parfois associé à un mécanisme de cheval de Troie impliquant les lymphocytes, entraînant alors le blocage du cycle cellulaire des cellules neurales, leur lyse, voir leur apoptose (de Vries and Harding 2023). Cette atteinte neurale peut mener dans certains cas à la mort de l'individu (Suthar, Diamond, and Gale 2013).

La dissémination est une étape cruciale de l'infection par le VWN. Elle est permise par l'arrivée des cellules dendritiques infectées au niveau des nœuds lymphatiques. Une fois présent dans les nœuds lymphatiques, le virus est véhiculé en périphérie par la lymphe, notamment vers la rate.

L'infection des organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques et rate) est alors le point de départ de la réponse immunitaire adaptative permettant de combattre plus efficacement l'infection. La mise en place d'une réponse adaptative permet le développement d'anticorps anti-WN utiles pour contrôler le virus et d'une réponse mémoire mobilisable en cas de nouvelles infections.

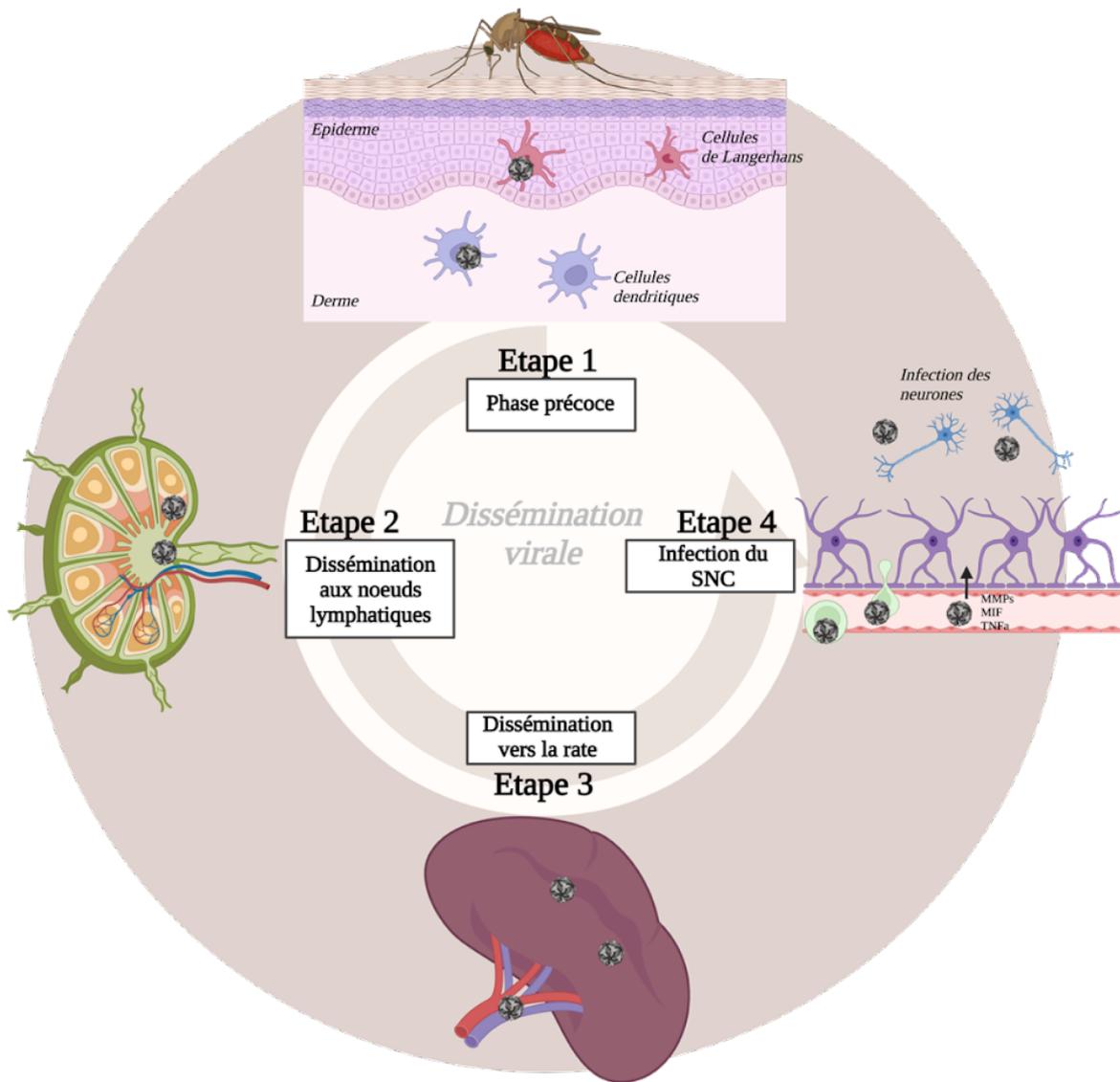


Figure 14. Dissémination du VWN chez les hôtes mammifères comme l'Homme.

(Étape 1) À la suite d'une pique par un moustique infecté, le virus va lors de la phase précoce infecter et se répliquer dans les cellules immunitaires de l'épiderme (cellules de Langerhans) puis les cellules immunitaires du derme (cellules dendritiques). (Étape 2) Le virus se réplique et se dissémine dans l'organisme vers les nœuds lymphatiques et la rate à partir du jour 4 après infection. (Étape 3) Les infections les plus graves sont dues à une infection du système nerveux central notamment lors du passage du virus au travers de la barrière hémato-encéphalique à partir du 8^{ème} jour. Ce passage peut s'opérer par trois voies détaillées dans le texte ci-après. Réalisation : Lise Fiacre, inspiré de (Suthar et al. 2013), réalisé via BioRender.

1.6.2. Atteinte du système nerveux central

Après dissémination aux organes viscéraux comme la rate, le VWN peut envahir le système nerveux central (SNC), composé du cerveau et de la moelle épinière, entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour qui suivent l'infection. Le passage dans le cerveau nécessite un franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par le virus. Une fois dans le SNC, le virus va endommager les neurones, l'hippocampe, le cortex, le cervelet mais aussi la moelle épinière (Suthar, Diamond, and Gale 2013).

1.6.2.1. Structure & fonction de la BHE

Le fonctionnement du cerveau est permis par un environnement neural maintenu dans une plage homéostatique étroite. Ceci est permis par une régulation stricte des transports cellulaires, moléculaires ou ioniques entre le sang et le cerveau. Cette régulation est le fruit du travail d'une barrière anatomique et physiologique unique. Sa description date du début du XXème siècle, par un scientifique allemand, Paul Ehrlich. Le concept actuel de barrière hémato-encéphalique, qui est la barrière entre le sang et le parenchyme nerveux, naît quant à lui en 1900.

La barrière hémato-encéphalique assure un rôle de séparation de la circulation sanguine et du système nerveux central afin de maintenir une homéostasie favorable au bon fonctionnement du cerveau. Cela permet de protéger le cerveau contre les infections en empêchant le passage des agents pathogènes, tout en permettant le passage des nutriments ainsi que l'évacuation des déchets (Serlin et al. 2015). La BHE est associée à deux autres barrières que sont la barrière sang/liquide céphalo-rachidien, ainsi que la barrière méningée (Fig.15) (Ariel D. et al. 2017).

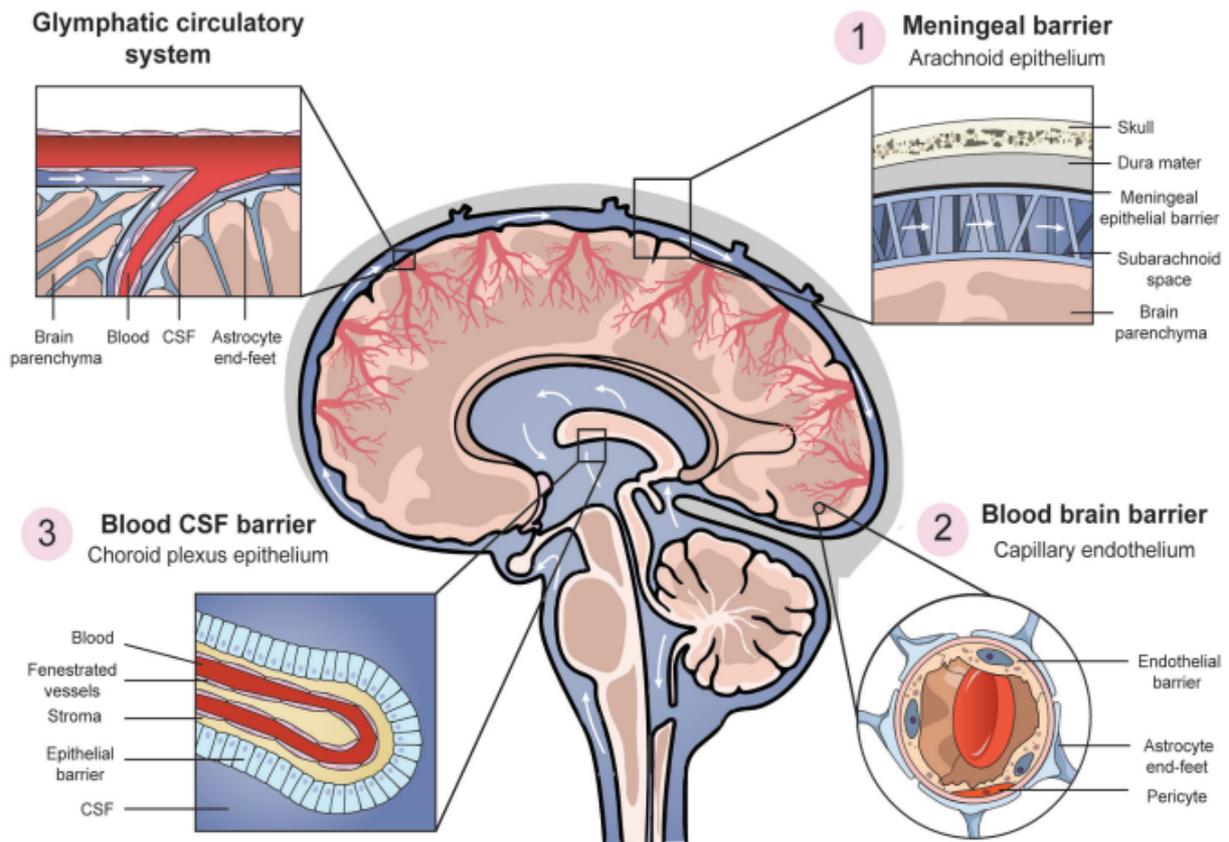


Figure 15. La fonction coordonnée de trois barrières cérébrales maintient le cerveau homéostatique environnant.

(1) La barrière méningée sépare la surface externe du cerveau des tissus environnants. (2) La barrière hémato-encéphalique sépare le sang du parenchyme cérébral. (3) La barrière hémato-céphalorachidienne au niveau du plexus choroïde sépare le sang du système ventriculaire. (Ariel D. et al. 2017)

La BHE est à l'interface entre le sang et le tissu cérébral (Persidsky et al. 2006) (Wolburg and Lippoldt 2002). Elle est composée principalement de cellules endothéliales (ECs) reliées entre elles par des jonctions cellulaires. Les cellules endothéliales ne sont pas responsables à elles seules de la formation de la BHE. L'activité de la BHE résulte en réalité de l'étroite collaboration entre les ECs et des cellules périvasculaires comme les péricytes et les astrocytes (Stamatovic et al. 2016) ainsi que la lame basale (*lamina basalis*). L'ensemble forme une unité appelée « unité neurovasculaire » responsable du maintien de l'homéostasie du SNC (Weiss et al. 2009).

1.6.2.2. Mécanismes de franchissement de la BHE

La BHE est composée de cellules endothéliales jointes par des jonctions serrées, servant à limiter le passage par voie paracellulaire. C'est une barrière physique, métabolique et immunitaire. Cependant, les nutriments peuvent être transportés du sang vers le cerveau, et les déchets provenant du cerveau retournent dans le sang de

l'organisme pour être éliminés. Certaines molécules doivent donc être en mesure de franchir la BHE, pour le bon fonctionnement du cerveau. Plusieurs mécanismes de transports spécifiques ainsi que des vésicules pinocytaires sont alors déployés, selon la nature chimique de la molécule à transporter.

La BHE joue également un rôle dans le passage des cellules immunitaires au cerveau, comme les leucocytes. Leur passage est possible via l'utilisation de molécules d'adhésion, sur ces derniers mais également sur les cellules endothéliales de la BHE. La fixation et le roulement des leucocytes est réalisées par des intégrines VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) et $\alpha 4\beta 7$ (Laschinger and Engelhardt 2000) et des molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1 (Greenwood et al. 2003).

Le rôle principal de la BHE étant de maintenir l'homéostasie cérébrale et de protéger contre les toxines et les agents pathogènes, la plupart des agents pathogènes ne parviennent pas jusqu'au cerveau. Cependant, certains d'entre eux ont déployé des mécanismes permettant de contourner la BHE, et d'effectuer alors un effet dit neuroinvasif. C'est notamment le cas de plusieurs bactéries comme *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* qui ont une multiplication extracellulaire ; mais également des bactéries à multiplication intracellulaire comme *Listeria monocytogenes* qui se multiplie à l'intérieur des macrophages, envahissant les méninges et responsable de méningites (Weiss et al. 2009). Les bactéries intracellulaires rejoignent le cerveau par une stratégie de « cheval de Troie », c'est-à-dire en colonisant des cellules immunitaires capables de franchir la BHE.

Les virus ont également réussi un franchissement de la BHE, comme c'est le cas avec VIH ou le Chikungunya. Des analyses post-mortem immunohistochimiques chez des patients atteints de VIH montrent une diminution de l'expression des occludines et des claudines-5 au niveau de l'endothélium (Persidsky et al. 2006). Des analyses *in vitro* montrent également que le virus HTLV-1 diminue la quantité de protéines jouant un rôle dans la formation des jonctions serrées comme ZO-1, associé à une augmentation de la perméabilité de la BHE et une augmentation de la sécrétion de TNF α et d'IL-1 α (Afonso et al. 2007). Mais le passage des virus au travers de la BHE semble également possible par le mécanisme de transcytose, comme pour le virus HIV, le HTLV-1 ou le cytomégalovirus (CMV) (Banks et al. 2002).

1.6.2.3. Neuroinvasion par le VWN

La charge virale dans le sang est un facteur essentiel modulant la dissémination du VWN au niveau du SNC (Klein and Diamond 2008). Une fois dans la circulation sanguine, la neuropathogénèse du VWN est permise à condition de réussir à franchir la BHE, responsable de la séparation sang/cerveau et permettant un maintien de l'homéostasie dans ce dernier (Samuel and Diamond 2005).

Le virus WN dispose de deux moyens pour atteindre le cerveau : (1) par transport axonal rétrograde le long de la moelle épinière lorsque le virus est injecté à proximité de neurones périphériques, ou bien (2) par voie

sanguine. Pour le passage par voie sanguine, le VWN peut utiliser 3 mécanismes pour franchir la BHE : le « cheval de Troie », la perméabilisation de la BHE (passage paracellulaire) ou bien l'amélioration de l'attachement du virus permettant son passage transcellulaire (Fig.16).

1.6.2.3.1. Mécanisme de « cheval de Troie »

Le mécanisme du « cheval de Troie » pourrait, comme pour le virus Visna (Peluso et al. 1985) être utilisé par le VWN afin d'atteindre le SNC. Ce mécanisme consiste à infecter des cellules immunitaires, comme les cellules dendritiques, puis de passer la BHE en étant à l'intérieur de celles-ci (Verma et al. 2009) (Constant et al. 2023).

1.6.2.3.2. Perte de l'intégrité de la BHE, perméabilisation et passage paracellulaire du virus

Un autre mécanisme de passage de la BHE par le virus pourrait être une perturbation de l'intégrité de la BHE, résultant en une perméabilisation de celle-ci et un passage paracellulaire du virus (Diamond et al. 2003). La perméabilité de la BHE est régulée par des cytokines vasoactives comme le TNF dont la sécrétion est régulée par le TLR3 (T. Wang et al. 2004) ainsi que par des métalloprotéinases (MMPs) telle que MMP-9, qui, lorsque leur concentration augmente dans l'espace extracellulaire, permet une dégradation des protéines impliquées dans les jonctions serrées (P. Wang et al. 2008). La perméabilité de la BHE est également augmentée par l'action de cytokines sécrétées cette fois-ci par les cellules dendritiques infectées, telles que MIF ou encore le TNF α (Arjona et al. 2007).

Des études menées chez la souris montrent que le TLR3 joue un rôle dans l'invasion du SNC (Wang et al. 2004) par le VWN, notamment en induisant la transcription du TNF α , ce qui favorise la perméabilisation de la BHE (Diamond and Klein 2004).

1.6.2.3.3. Amélioration de l'attachement et de l'internalisation du virus par les cellules endothéliales

La première hypothèse est donc une amélioration de l'attachement et du passage transcellulaire du virus au travers des cellules endothéliales (ECs). Verma *et al.* (2009) montrent par une expérience *in vitro* sur ECs que le virus WN NY99, une souche très neurovirulente et glycosylée sur sa protéine E, induit la transcription et la traduction de protéines impliquées dans les jonctions serrées, comme les claudine-1, ainsi que la transcription et la traduction de molécules d'adhésion cellulaire (CAM) et de la sélectine-E. L'induction a lieu 2-3 jour post-

infection ce qui coïncide avec le pic de réplication virale. Les résultats montrent que le VWN pourrait franchir la BHE sans compromettre son intégrité (Verma et al. 2009).

Plusieurs études montrent le rôle de la glycosylation de la protéine E dans la neuroinvasion et la neurovirulence du VWN (Beasley et al. 2005) (Alsaleh et al. 2016). La protéine E structurale, notamment son domaine III (Chu et al. 2005) pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance et la liaison aux ECs (Kaufmann and Rossmann 2011). Enfin, les cellules endothéliales microvasculaires expriment à leur surface le facteur d'attachement DC-SIGNR (Bashirova et al. 2001) qui est un récepteur transmembranaire de type II à domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRDs) ; or, il semblerait que la glycosylation de la protéine E permette un attachement à DC-SIGNR, ce qui pourrait être une des clés du passage du VWN au travers des ECs (Davis et al. 2006).

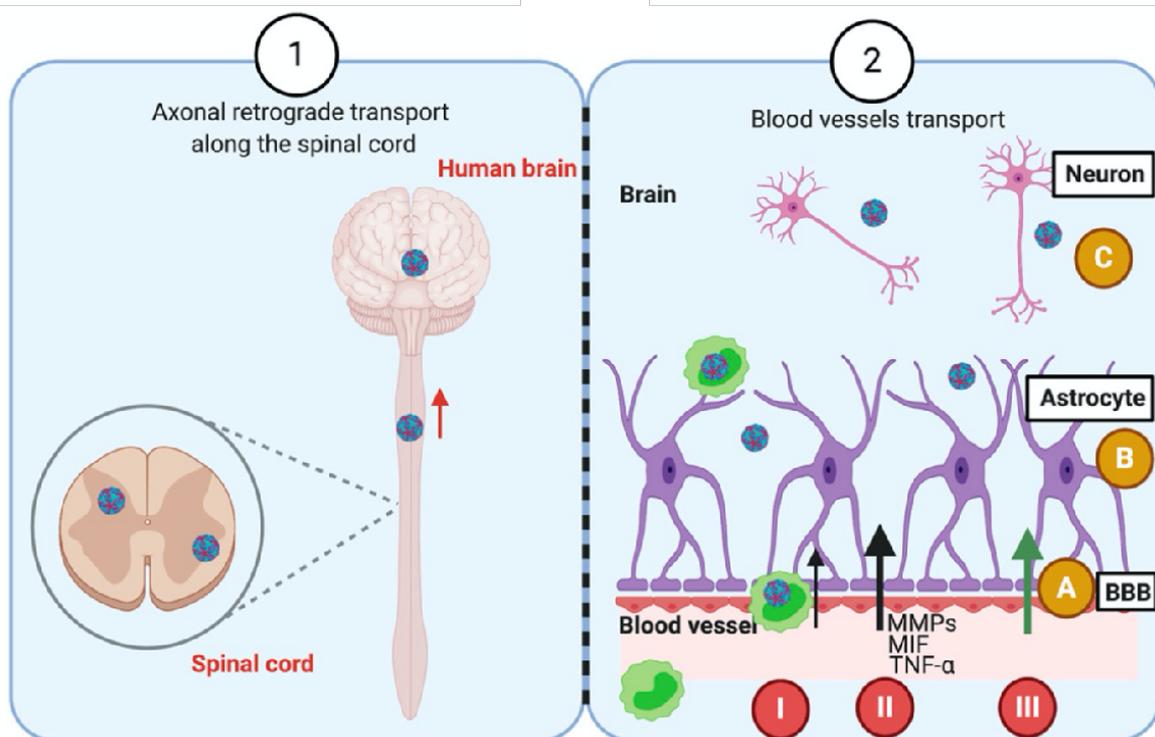


Figure 16. Mécanismes d'entrée du VWN dans le SNC.

Malgré un mécanisme encore incertain, le VWN semble pouvoir entrer dans le SNC selon deux grands mécanismes. (1) le premier est un transport axonal rétrograde par les neurones périphériques le long de la moelle épinière. Le transport le long de la moelle épinière pourrait être la cause d'une paralysie flasque. La possibilité d'une entrée dans le cerveau par cette voie n'est pas certaine. (2) le second est par voie sanguine. Trois étapes sont nécessaires pour permettre la neurovirulence par voie sanguine : (A) le passage de la BHE - (B) l'interaction du virus avec les cellules du cerveau - (C) l'infection des neurones. Plusieurs mécanismes sont possibles afin de franchir la BHE : (I) le « cheval de Troie » qui est l'internalisation intracellulaire dans des cellules immunitaires comme les monocytes et/ou les macrophages, du virus et le passage de la BHE dans celles-ci. (2) la perméabilisation de la BHE (passage paracellulaire) à la suite de la sécrétion de cytokine comme TNF α médié par le TLR-3 (T. Wang et al. 2004), la cytokine MIF produite par les leucocytes et qui va à son tour induire la production de MMPs (Arjona et al. 2007). (3) l'amélioration de l'attachement du virus, possiblement grâce à la glycosylation de la protéine E et le passage transcellulaire. (Klein and Diamond 2008). D'après (Fiacre et al, 2020)

Une fois arrivé dans le SNC, le virus WN peut dans certains cas entraîner des anomalies, lésions, au niveau du cerveau et des méninges. Les régions principalement touchées sont les ganglions de la base, le tronc cérébral, les cornes ventrales, le thalamus ou encore la moelle épinière (Brilla et al. 2004).

1.6.3. Modèles *in vivo* d'étude de la pathogenèse du virus West Nile

Différents modèles animaux sont utilisés pour étudier l'infection au VWN, que ce soit pour l'étude de la réponse chez les mammifères, chez l'oiseau ou encore chez le vecteur moustique.

Chez les oiseaux, le poulet *Gallus Gallus* a été largement utilisé notamment afin d'évaluer la réponse immunitaire, le développement ou encore le vieillissement (Austad 2011). L'utilisation d'autres espèces reste particulièrement compliquée due entre autres à la disponibilité des individus.

Certaines expérimentations se sont basées sur l'utilisation d'espèces aviaires présentes dans l'avifaune sauvage. En effet, depuis 1955, 77 espèces d'oiseaux, principalement des passereaux, ont été utilisées lors d'infections expérimentales par le VWN (Pérez-Ramírez, Llorente, and Jiménez-Clavero 2014).

Concernant l'hôte mammifère, la plupart des études sont réalisées sur des souris consanguines comme les BALB/cByJ (citer notre publi) ou encore les souris C57BL/6 (Desai et al. 2021) qui ont l'avantage de permettre une bonne reproductibilité des analyses, tant leur patrimoine génétique est proche. Contrairement au virus Usutu, l'ensemble des lignées de souris de laboratoire sont sensibles à l'infection au VWN, notamment grâce à l'introduction d'une mutation générant un codon stop dans une séquence codante pour une oligoadénylate synthétase (Mashimo et. al 2022).

Enfin, la caractérisation du cycle de transmission du VWN bénéficie d'études de compétence vectorielle des moustiques. Pour cela, les principales espèces infectées en laboratoire sont *Culex pipiens* (Vaughan, Newman, and Turell 2022) (H. Wang et al. 2020) ainsi que *Culex quinquefasciatus* (McGregor, Kenney, and Connelly 2021) ou encore *Culex tarsalis* (McGregor, Kenney, and Connelly 2021), largement connus comme vecteurs du virus.

Plusieurs modèles d'études ont été développés pour mieux appréhender le comportement du virus dans ses différents/hôtes vecteurs. Tandis que certaines analyses sont impossibles en l'absence d'un modèle *in vivo* (cf la compétence vectorielle), d'autres études comme la neuroinvasion, ou l'étude de la réponse immunitaire, se renforcent par l'utilisation raisonnée de modèles *in vivo*.

1.7. Manifestations cliniques

1.7.1. Manifestations cliniques chez l'oiseau

Les oiseaux sont les hôtes principaux du VWN, et ne présentent habituellement pas de signes cliniques. Toutefois, il est parfois possible d'observer une léthargie, des plumes ébouriffées, une difficulté de mouvement, ainsi qu'une perte d'appétit conduisant à une perte de poids (Gamino and Höfle 2013), avec un décès possible 24h après les premiers signes cliniques (Jiménez de Oya et al. 2018). Plus rarement, il est possible d'observer des sécrétions orales et nasales abondantes, une déshydratation et des convulsions.

1.7.2. Manifestations cliniques chez l'Homme

La période d'incubation du VWN est comprise entre 2 et 15 jours (Petersen and Marfin 2002). Environ 80% des cas humains d'infection au VWN sont asymptomatiques. Dans 20% des cas, les patients vont développer un état fébrile, des myalgies, des céphalées, une grande fatigue ou encore des complications intestinales. Même si la plupart des patients se remettent très bien d'une infection au VWN, certains présentent des signes de fatigue ou de maux de tête persistants pendant une longue période suivant l'infection. Moins de 1% des cas évoluent en complications neurologiques, comme une paralysie flasque, une méningite ou une encéphalite (Sevjar et al. 2003). Les symptômes de l'encéphalite due au VWN peuvent aller de symptômes pseudo-grippaux avec un état confusionnel léger, à l'encéphalopathie, au coma ou à la mort. Les encéphalites sont particulièrement graves chez les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (Fischer 2008). Un examen neurologique montre une diminution de l'état de conscience, une léthargie, des troubles dans la personnalité ainsi que des tremblements (Sevjar et al. 2003).

1.7.3. Manifestations cliniques chez le cheval

Tout comme chez l'Homme, la plupart des infections chez le cheval sont asymptomatiques. Seuls 20% présentent des signes cliniques, avec des atteintes plus graves que chez l'Homme (Angenvoort et al. 2013). Il est possible d'observer des atteintes neurologiques ainsi qu'une inflammation du système nerveux. Les chevaux infectés peuvent développer une ataxie, une faiblesse postérieure, une quadriplégie, des convulsions, une hépatite, des paralysies de la langue, un myosis pupillaire, une cécité partielle et une dépression. Les juments sont moins touchées, et les chevaux âgés, contrairement aux Hommes, sont moins souvent touchés par la maladie (Byas and Ebel 2020). Alors qu'1% des infections sont létales chez l'Homme, c'est 30 à 50% des infections qui conduisent à la mort chez le cheval (Silva et al. 2019) (Ward et al. 2006).

1.8. Réponse antivirale chez le mammifère

1.8.1. Voies de signalisation impliquées dans la réponse antivirale

Les virus ou encore les cellules infectées vont exprimer à leur surface des motifs PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns, motifs moléculaires endogènes associés à l'agent pathogène, comme l'ADN ou l'ARN), qui sont partie intégrante de l'agent pathogène qui vont être reconnus comme des signaux de « danger » exogènes par les récepteurs PRRs (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires) des cellules immunitaires sentinelles (cellules dendritiques, macrophages).

À la suite de cela, les cellules de la réponse innée du SI vont sécréter des médiateurs de la réponse immunitaire qui vont avec les cellules présentatrices d'antigènes induire la réponse immunitaire adaptative. L'activation des réponses immunitaires innée et adaptative à la suite d'une infection au VWN se fait par le biais de quatre grandes voies : (1) la voie de signalisation dépendante des récepteurs RIG-I-like (RLR) ; (2) la voie de signalisation dépendante des récepteurs Toll-like (TLR) ; (3) la réponse anti-VWN médiée par l'IFN de type I ; (4) les récepteurs NOD-like (Suthar, Diamond, and Gale 2013). La plupart des descriptions faites de la réponse immunitaire induite par l'infection au VWN, ont été analysées via l'utilisation de modèles murins (Brostoff et al. 2016).

1.8.1.1. Activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs RIG-I-like (RLRs)

Parmi les RLRs, il est possible de compter non seulement le récepteur RIG-I (protéine du gène I inducible par l'acide rétinoïque), mais également les récepteurs MDA5 (antigène 5 de différenciation des mélanomes) et LGP2. Les récepteurs RLRs sont exprimés par la quasi-totalité des cellules de l'organisme à un niveau basal, qui peut être augmenté en présence d'IFN lors de l'induction de la réponse immunitaire. Les protéines RLRs font parties de la famille des hélicases. Les RLRs reconnaissent des signatures PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) à la surface du virus et induisent différentes voies de signalisation conduisant à la production d'IFN de type I. RIG-I intervient dès le début de l'infection alors que MDA5 semble intervenir dans l'amplification de la réponse innée (Fredericksen et al. 2008). Les récepteurs RIG-I et MDA5 possèdent deux domaines impliqués dans le recrutement de MAVS (mitochondria antiviral-signaling protein) ainsi que dans l'activation de caspases ainsi qu'un domaine hélicase servant à reconnaître les ARN viraux (Saito and Gale 2008). Les protéines PAMPs du VWN peuvent donc être reconnues à la fois par RIG-I et MDA5. Enfin LGP2 ne semble pas nécessaire à la réponse immunitaire innée et peut être régulé positivement ou négativement.

1.8.1.2. Activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs Toll-like (TLR)

La famille des TLRs se compose de 10 protéines chez l'Homme et de 12 protéines chez la souris. Ces protéines transmembranaires sont localisées à la surface cellulaire au niveau de la membrane plasmique, ou alors au niveau de compartiments intracellulaires comme le lysosome, l'endosome ou le réticulum endoplasmique. Les TLRs se composent d'un domaine « extracellulaire » riche en motifs LRR (*leucine-rich region*), un domaine transmembranaire et un domaine « intracellulaire » contenant un « domaine de mort ».

D'une façon générale, les récepteurs TLRs sont impliqués dans l'activation de cascades de signalisation permettant l'induction de la transcription et de la traduction de gènes impliqués dans la défense immunitaire de l'hôte suite à l'infection par un micro-organisme. Après fixation du ligand (pouvant être dans certains cas un acide nucléique), le TLR se dimérise et subit des changements conformationnels ce qui permet de recruter des molécules adaptatrices contenant un domaine TIR. Il existe 4 molécules adaptatrices qui sont les suivantes : (1) MyD88 ; (2) TIR-associated protein (TIRAP)/MyD88-adaptor-like (MAL) ; (3) TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN- β (TRIF)/TIR-domain-containing molecule 1 (TICAM1) ; (4) TRIF-related adaptor molecule (TRAM) (Akira, Uematsu, and Takeuchi 2006).

Comme pour les récepteurs RLRs, les récepteurs TLR3, TLR7 et TLR8 reconnaissent donc les motifs PAMPs du VWN ce qui enclenche des cascades de signalisation permettant l'activation de la réponse innée du système immunitaire. Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques. TLR3 est capable de reconnaître de l'ARNdb tandis que TLR7 & TLR8 reconnaissent les régions riches en GU des ARNsb. Une fois le ligand lié au compartiment endosomal, TLR3 recrute TRIF qui à son tour permet le recrutement de facteurs de transcription tels que IRF3, IRF7 et NF- κ B permettant la transcription et la traduction d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires. Le rôle du TLR3 dans la réponse immunitaire au VWN reste cependant controversé. Wang T *et al.*, montrent que des souris *Tlr3*^{-/-} sont plus résistantes à une infection par le VWN, ce qui pourrait être expliqué par une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi qu'une réduction de la perméabilité de la BHE (T. Wang et al. 2004). En revanche, Daffis *et al.*, montrent que le même type de souris *Tlr3*^{-/-} sont plus sensibles à l'infection par le VWN (Daffis et al. 2008).

1.8.1.3. Activation de la réponse anti-VWN médiée par l'IFN de type I

Les récepteur RLRs et TLRs permettent l'activation des facteurs de transcription IRF3 & IRF7. Or IRF3 & IRF7 sont très importants dans la régulation de la réponse médiée par l'IFN de type I. Ils agissent en tant que facteurs de transcription permettant l'induction de la transcription des gènes codant les protéines IFN de type I. Une fois les IFN de type I produits, ils sont sécrétés au niveau extracellulaire et agissent comme ligand au niveau des récepteurs membranaires IFNAR. La fixation des IFN de type I (comme IFN β) sur leur récepteurs IFNAR entraîne l'activation de la voie des kinases TYK2/JAK1. L'activation des kinases TYK2 et JAK1

conduit à la phosphorylation des STAT1 et STAT2, suivi de la formation du complexe ISGF3 composé de STAT1, STAT2 & IRF9. Le complexe ISGF3 passe au niveau nucléaire afin d'agir comme un facteur de transcription permettant l'activation de la transcription des gènes ISGs (IFN-stimulated genes) (Suthar, Diamond, and Gale 2013)

En parallèle, le régulateur de NF-kB, nommé IKKe, phosphoryle STAT1 au niveau de la sérine 708 ce qui entraîne une diminution de l'affinité du complexe ISGF3, provoquant l'induction de l'expression de gènes dépendants d'IKKe, tels que les gènes IFIT2 et ADAR1 (Perwitasari et al. 2011).

1.8.1.4. Les récepteurs NOD-like (NLRs)

Les récepteurs NOD-like sont tout comme les récepteurs TLRs des récepteurs impliqués dans la reconnaissance d'agents pathogènes et permettant la réponse immunitaire tant innée qu'adaptative. Contrairement aux récepteurs TLRs qui sont transmembranaires, les récepteurs NLRs sont cytoplasmiques. La famille des NLRs est divisée en quatre sous-familles distinguées selon leur séquence N-terminale : NLRA, NLRB, NLRC & NLRP. Les protéines NLRs sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires qui sont : (1) l'assemblage de l'inflammasome, qui est un complexe protéique oligomérique, activateur de la caspase-1 (B. K. Davis, Wen, and Ting 2011) et impliqué dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de la famille des IL-1B, telles qu'IL-1B, IL-18 & IL-33 - (2) la transduction du signal - (3) l'activation de la transcription et (4) l'autophagie. Les récepteurs NLRs sont impliqués dans la reconnaissance de ligands issus d'agents pathogènes microbiens tels que les peptidoglycanes, les hyphes fongiques ou encore l'ARN viral. Ils reconnaissent les éléments PAMPs et DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns ou DAMPs, motifs moléculaires associés aux dommages). Concrètement les PAMPs correspondent à des acides nucléiques de l'agent pathogène tandis que les DAMPs correspondent à ce qui est relargué par une cellule en milieu extra-cellulaire lorsqu'elle est infectée. Ce relargage au niveau extra-cellulaire devient alors détectable par le système immunitaire.

La plupart des NLRs agissent comme des PRRs c'est-à-dire en reconnaissant les ligands et en induisant les réponses inflammatoires correspondantes même si certains d'entre eux n'agissent qu'en réponse aux cytokines.

L'inflammasome NLRP3 est un complexe protéique multimérique cytosolique composé de sous-unités protéiques qui permet l'activation de la Caspase-1. Une fois active, la Caspase-1 permet la maturation de la cytokine pro-inflammatoire IL-1B, qui est un médiateur puissant de l'inflammation (Kim, Shin, and Nahm 2016). En dehors d'une infection au VWN, la surexpression d'IL-1B peut dans certains cas être associée à diverses pathologies auto-inflammatoires comme la goutte, la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), ou encore les syndromes fébriles périodiques associés à la cryopyrine (CAPS) (Jesus and Goldbach-Mansky 2014) (Ozkurede and Franchi 2012). Dans le cas d'une infection au VWN, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1B résultant sont associées à la protection de l'hôte contre le virus WN. La signalisation

dépendante de l'IL-1 est une voie de signalisation largement connue comme étant impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires sur le lieu de l'infection suite à une infection virale, conférant à l'IL-1 des propriétés antivirales (Das et al. 2008). En effet, IL-1B est reconnu pour être impliqué dans la migration des cellules de Langerhans au niveau des nœuds lymphatiques (Byrne et al. 2001) ainsi que dans la migration des macrophages CD45+ et des lymphocytes CD8+ au niveau du SNC des souris infectées par le virus WN (Ramos et al. 2012). De la même façon, IL-1B pourrait être impliqué dans la migration des cellules immunitaires vers les sites de l'infection. Enfin, l'IL-1B pourrait moduler la capacité du virus WN à se répliquer dans les neurones. En effet, Ramos *et al.*, ont montré que la perte de la signalisation IL-1B induit la réplication du VWN dans les neurones.

1.8.2. Réponse immunitaire innée

À la suite d'un repas sanguin par un moustique infecté par le VWN chez un hôte mammifère, le virus est transmis par le vecteur au niveau de la peau. La peau constitue la première ligne de défense contre les agressions extérieures, dont les infections virales. Elle est composée de trois couches distinctes qui sont l'épiderme, dont les principales cellules sont les kératinocytes – le derme, principalement constitué de fibroblastes et enfin l'hypoderme constitué d'adipocytes. La peau renferme également de nombreuses cellules immunitaires œuvrant dans la réponse immunitaire.

1.8.2.1. Mécanisme de la réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense mise en place à la suite de l'infiltration de l'agent pathogène dans le tissu cutané. Elle est initiée par les cellules immunitaires de l'épiderme que sont les cellules de Langerhans, premier lieu de réplication du VWN. Le virus exprime à sa surface des motifs PAMPs reconnus par les récepteurs PRRs à la surface des cellules de Langerhans. Le VWN pénètre également au niveau du derme où il rencontre les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques du derme ou encore les macrophages. L'ensemble de ces cellules, après reconnaissance du virus, induisent la transcription et la traduction de gènes cibles codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires tels que IFN β , TNF α , etc. L'activation de la sécrétion des IFN de type I est une étape essentielle de la réponse immunitaire innée. La transcription et la traduction de gènes codant des IFN de type I se fait suite à l'activation des voies RLRs et TLRs qui sont les deux voies cellulaires majeures induites lors de la reconnaissance de l'agent pathogène par les cellules de l'immunité innée. Il en résulte une forte production d'IFN de type I qui vont à leur tour se fixer sur les récepteurs IFNR1 et IFNR2 présents à la surface des cellules immunitaires innées. Une fois

le virus reconnu par les PRRs sur les macrophages et les cellules de Langerhans et les récepteurs DC-SIGN présents sur les cellules dendritiques du derme, il est phagocyté. Il en résulte une production d'antigène correspondant au virus phagocyté. Ces antigènes sont alors présentés à la surface des cellules dendritiques du derme, des cellules de Langerhans et des macrophages au niveau des CMH de classe II. Ces cellules peuvent alors mettre en place leur rôle de cellules présentatrices d'antigène, migrer au niveau des organes lymphoïdes secondaires et présenter l'antigène issu de la phagocytose du virus, aux LT CD4, un interrupteur obligatoire du déclenchement de la réponse immunitaire acquise (Fig.17).

1.8.2.2. Contournement de la réponse innée par le virus West Nile

L'évasion de la réponse immunitaire par le VWN se fait principalement par deux stratégies qui sont : l'évasion passive de l'interaction avec les PRRs ou bien l'inhibition active de différentes étapes clés impliquées dans la production d'IFN de type I (Fig.17).

1.8.2.2.1. Évasion passive de l'interaction avec les PRRs

Le mécanisme d'évasion passive retarde l'activation de IRF3 probablement en empêchant les cellules hôtes de détecter les virus. Fredericksen *et al.*, ont montré que le retard dans l'activation de IRF-3 n'est pas dû à un blocage direct dans la voie RIG-I ou du TLR3. Il semble plutôt que le virus empêche la cellule de détecter la réplication virale, par un mécanisme non élucidé. Ainsi, le virus peut se répliquer à de forts titres avant que la cellule hôte ne puisse développer une réponse antivirale efficace (Fredericksen and Gale 2006).

1.8.2.2.2. Inhibition active de la signalisation et de la production d'IFN de type I

Plusieurs mécanismes visent à inhiber la signalisation et la production d'IFN de type I. L'inhibition se fait principalement par une action des protéines non structurales au niveau des voies de signalisation RLRs et TLRs ; il en résulte une inhibition de la transcription et de la traduction des IFN de type I. La **protéine NS1** inhibe la signalisation induite par le récepteur endosomal TLR3 en empêchant la translocation nucléaire de IRF3 et NF-κB (Wilson et al. 2008). Il en résulte une absence de la transcription et de la traduction de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines. La **protéine NS2A** inhibe la transcription du gène IFN-B (Wilson et al.

2008). L'expression des **protéines non-structurales** empêche l'accumulation du récepteur IFNR1 en activant des voies de dégradation des protéines, ce qui contribue à l'inhibition de la voie IFN (Evans et al. 2011). **NS4B** empêche la phosphorylation et donc l'activation des kinases JAK1 & Tyk2 ce qui a pour conséquence l'inactivation de la voie médiée par l'IFN de type I et *in fine* l'absence de transcription des gènes ISGs. La **protéine NS5** pourrait être un antagoniste de la signalisation de l'IFN en empêchant la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT1 (Laurent-Rolle et al. 2010). Enfin, la réplication du VWN dans les cellules de l'hôte nécessite des réarrangements membranaires particuliers dont les mécanismes ne sont pas encore élucidés. Toutefois, Mackenzie *et al.* ont montré que **le VWN augmente la biosynthèse du cholestérol** ce qui induit un changement dans l'homéostasie du cholestérol. Ce changement dans la redistribution du cholestérol cellulaire inhibe la voie JAK/STAT de réponse à l'infection, ce qui constitue une autre voie de régulation de la transcription des gènes ISGs.

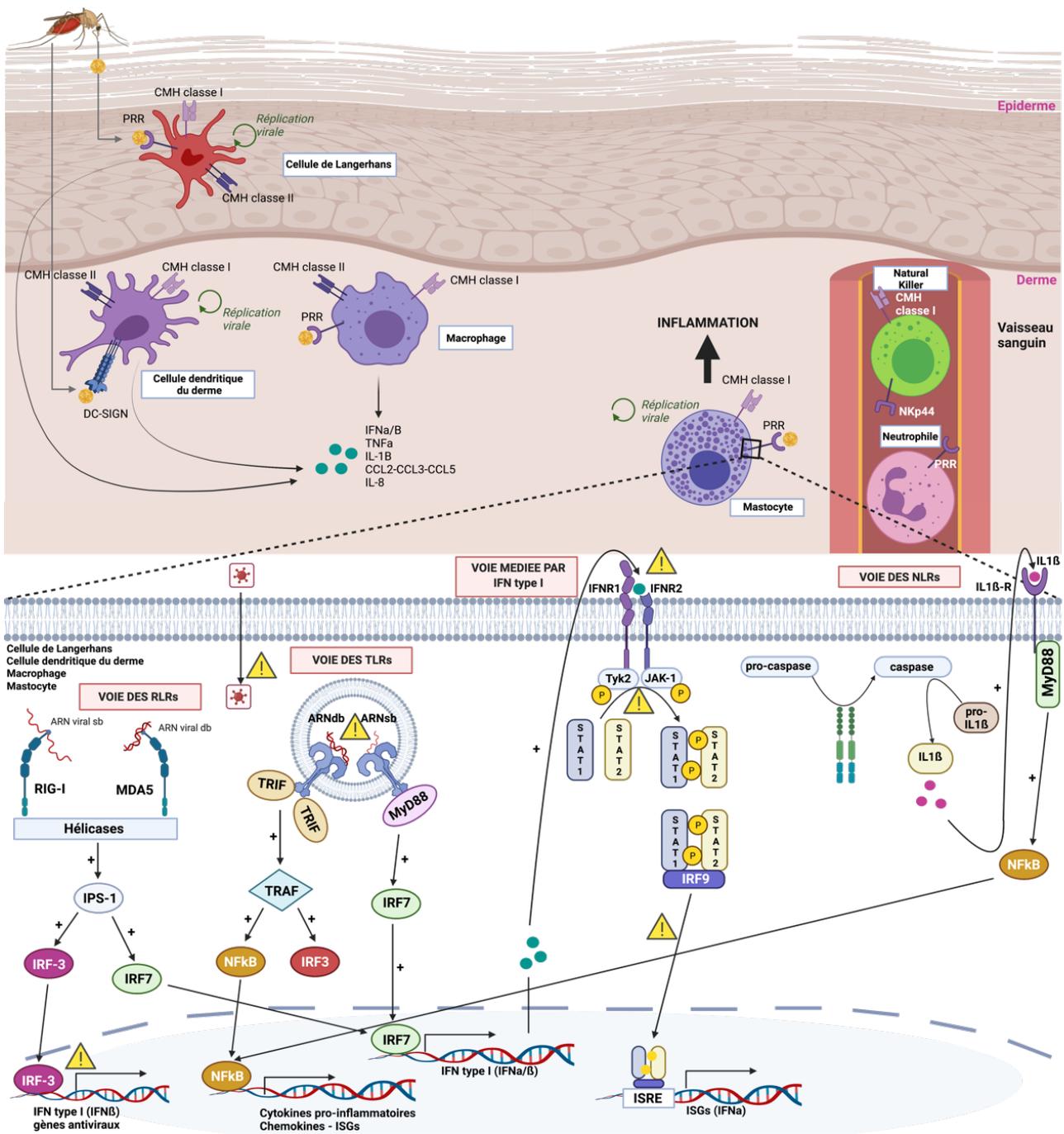


Figure 17. Activation des cellules immunitaires à la suite de l'infection au VWN.

Chez les mammifères, l'infection au VWN fait suite à une piqûre par un moustique infecté, au niveau de l'épiderme. L'épiderme, et notamment les cellules de Langerhans appartenant au système immunitaire inné sont le premier lieu de réplication du virus. La reconnaissance du virus se fait par leur récepteur PRR qui se trouve à la surface des cellules. Les cellules de Langerhans activées vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que IFN α /B, TNF α , IL-18, CCL2, CCL3, CCL5 et IL-8. Le VWN peut également être reconnu au niveau du derme par les cellules dendritiques du derme, les macrophages et les mastocytes. La reconnaissance au niveau des cellules dendritiques se fait via le récepteur DC-SIGN spécifique de ce type cellulaire, et par le récepteur PRR au niveau des mastocytes. Une réplication virale s'effectue alors au niveau des cellules dendritiques et des mastocytes. Les neutrophiles sont des cellules du système immunitaire inné présent dans le sang et qui vont migrer dans les tissus infectés par chimiotactisme. Les neutrophiles jouent un rôle de pivot entre la réponse immunitaire innée et la réponse acquise. Ils reconnaissent le virus, l'ingèrent, le digèrent dans

les lysosomes puis produisent des peptides antigéniques. Une fois actifs ils expriment le CMH de classe II et peuvent agir comme des cellules dendritiques notamment par activation des cellules LT. Ils agissent également dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques. Les cellules NK sont des cellules principalement sanguines jouant un rôle de sentinelles et induisant la mort des cellules infectées par lyse. La **réponse immunitaire intrinsèque** s'effectue via quatre voies : (1) la voie des RLRs ; (2) la voie des TLRs ; (3) la voie médiée par les IFN de type I ; (4) la voie des NLRs. Ces quatre voies se mettent en place à la suite de la reconnaissance du virus par la cellule immunitaire, dans le but d'induire la transcription et la traduction de gènes codants essentiellement pour des cytokines pro-inflammatoires. La sécrétion de ces cytokines permet alors l'induction des cellules pivots entre la réponse innée et la réponse adaptative. Chacune des voies présentées est détaillée dans le corps du texte. Les panneaux « attention » sont placés aux différents endroits où le VWN a su développer des stratégies de contournement de la réponse immunitaire. Ces stratégies sont développées dans le corps du texte. Réalisation : Lise Fiacre, réalisé via BioRender.

1.8.3. Réponse immunitaire adaptative

1.8.3.1. Mise en place de la réponse adaptative

La réponse immunitaire adaptative à la suite de l'infection au VWN s'effectue à la suite de la présentation des peptides antigéniques par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) au niveau des lymphocytes TCD4. La reconnaissance des peptides viraux présentés par le CMH de classe II des CPA entraîne l'activation et la prolifération des TCD4, ainsi que leur différenciation en TCD4 auxiliaires et mémoires. Ces cellules sont des éléments essentiels de l'enclenchement de la réponse adaptative et mémoire. Les lymphocytes B (LB) reconnaissent directement l'agent pathogène par leur récepteur membranaire qui est une immunoglobuline ancrée à la membrane. Cette interaction permet aux LB d'internaliser et de processor l'antigène et de le présenter via leur CMH de classe II aux TCD4 auxiliaires, comme l'ensemble des CPA. L'interaction des LB avec les TCD4 auxiliaires permet l'activation des LB via notamment les interleukines IL-2, IL-4 et IL-5. Les LB actifs peuvent alors se différencier en lymphocytes B mémoires dans le but de mieux réagir lors d'une nouvelle infection, ou alors se différencier en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps permettant l'élimination de l'agent pathogène. Enfin, les lymphocytes TCD8 reconnaissent des peptides viraux présentés par le CMH de classe I des CPA et sont activés par les lymphocytes TCD4 auxiliaires notamment par des cytokines comme l'IL-2 et IFN γ , permettant alors au lymphocyte TCD8 de se différencier en cellule mémoire ou en cellule cytotoxique capables de lyser des cellules infectées. Enfin, l'arrivée du virus au niveau nœuds lymphatiques est une étape cruciale dans la réponse immunitaire, puisque cela permet le déclenchement de la réponse adaptative. Toutefois, c'est également lors du passage du virus au niveau des nœuds lymphatiques, que l'échange entre la lymphe et le sang permet une entrée du virus dans la circulation sanguine et donc la dissémination au niveau des organes (Fig.18).

La réaction immunitaire adaptative a pour but d'exercer une protection de l'hôte contre le VWN, en tentant de l'éliminer tout en le préparant au mieux pour répondre à une potentielle nouvelle future infection.

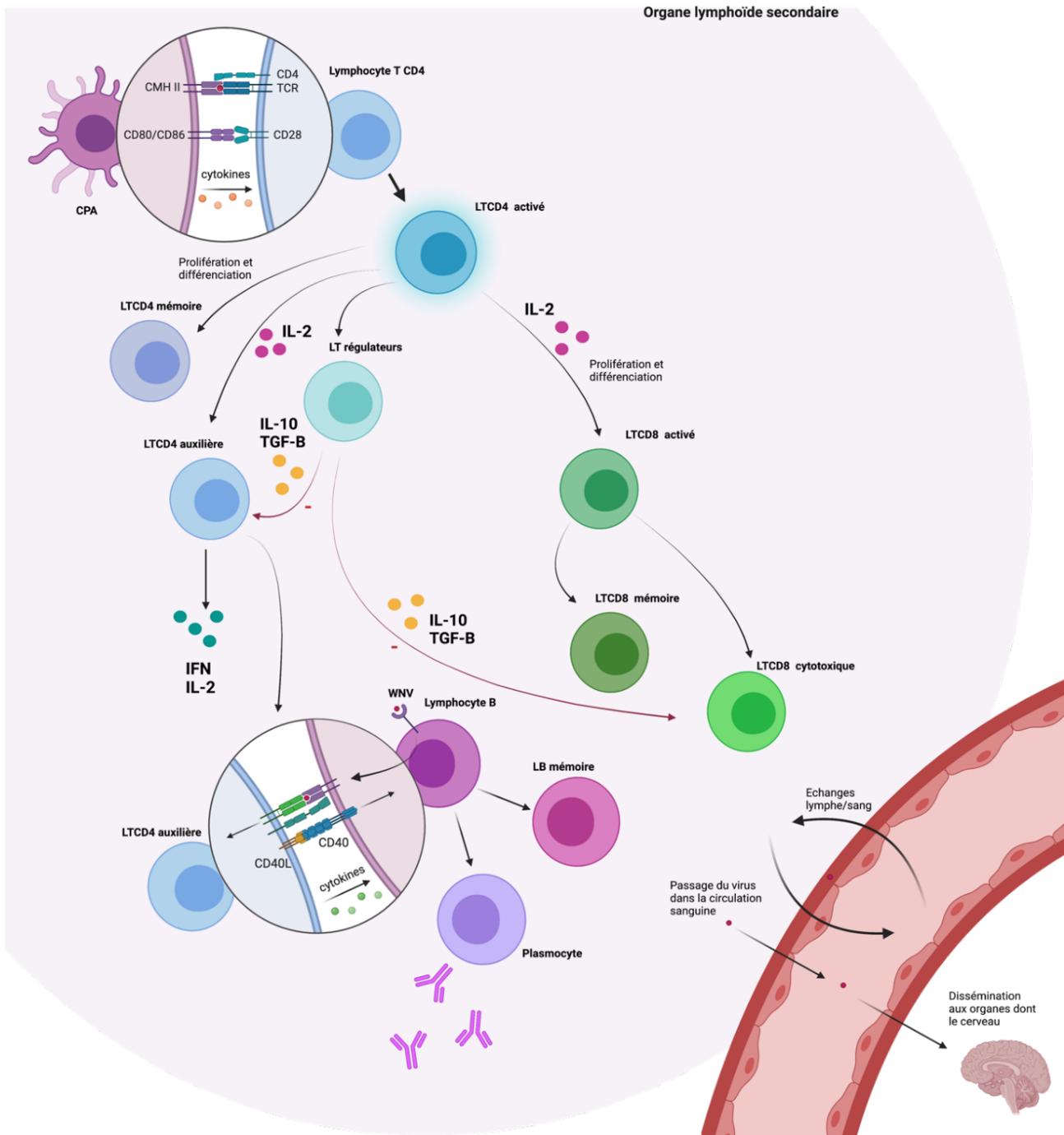


Figure 18. Déroulement de la réponse immunitaire adaptative au VWN.

La réponse adaptative débute par une interaction entre les cellules présentatrices d'antigène et le lymphocyte TCD4. La CPA présente le peptide antigénique au niveau de son CMH de classe II au récepteur TCR CD4. En parallèle se déroule un signal de co-stimulation entre les ligands CD80/CD86 de la CPA et la molécule CD28 du lymphocyte TCD4. Le lymphocyte TCD4 actif se différencie en lymphocyte T régulateur, lymphocyte TCD4 auxiliaire (sous l'action d'IL-2) et lymphocyte TCD4 mémoire. Il existe différents types de lymphocyte TCD4 auxiliaires et certains d'entre eux permettent l'activation des lymphocytes B, notamment par la présentation du peptide antigénique par le CMH de classe II présent à la surface du lymphocyte B ainsi que l'interaction de la glycoprotéine membranaire CD40 du lymphocyte B avec son ligand CD40L présent à la surface du lymphocyte TCD4 auxiliaire. Une fois activé, le

LB peut se différencier en LB mémoire ou en plasmocyte sécrétant des anticorps spécifiques. D'autre part, le lymphocyte TCD4 activé permet également l'activation des lymphocytes TCD8 qui vont pouvoir proliférer et se différencier en lymphocytes TCD8 mémoire et en lymphocytes TCD8 cytotoxique sous l'action d'IL-2. Les lymphocytes TCD8 cytotoxiques permettent la destruction des agents pathogènes intracellulaires par libération de diverses molécules telles que la perforine conduisant à la lyse cellulaire. Aussi, une fois arrivé dans les organes lymphoïdes secondaires, les échanges entre la lymphe et la circulation sanguine permettent au virus de passer dans le système vasculaire et d'être disséminé aux organes dont le cerveau (sous réserve d'un franchissement de la BHE). Réalisation : Lise Fiacre, réalisé via BioRender.

1.8.3.2. Détection d'anticorps IgG et IgM

La réponse immunitaire adaptative permet la sécrétion d'anticorps afin que l'organisme puisse réagir plus rapidement et efficacement en cas d'une nouvelle infection. Dans un premier temps, les IgM sont sécrétés très précocement, deviennent détectables en moins d'une semaine post-infection et persistent dans l'organisme jusqu'à 2-3 mois chez le cheval voire 4 mois ou parfois jusqu'à un an chez l'Homme. En second lieu, le switch IgM-IgG dans les lymphocytes B permet la production d'IgG reconnaissant mieux l'antigène, détectables plusieurs jours après infection, mais persistant plus d'un an après infection. Ils apparaissent 6 à 8 jours après les premiers symptômes chez la souris et 12 jours chez l'Homme (Samuel and Diamond 2006). L'ARN viral peut être détecté dans la première semaine qui suit l'infection et jusqu'à trois semaines dans l'urine, après l'infection (Fig.19).

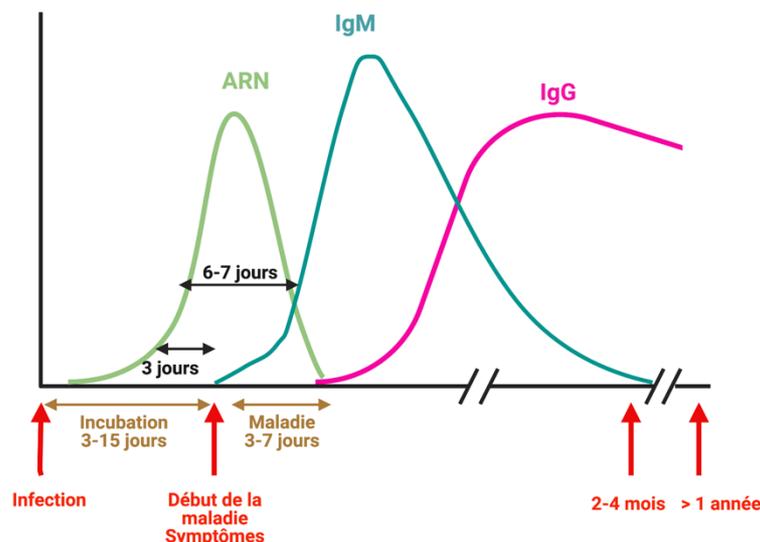


Figure 19. Période de détection du génome viral et des anticorps à la suite d'une infection au VWN.

D'après la Thèse de Céline Bahuon, 2012.

1.8.4. Impact du vieillissement sur la réponse immunitaire

Les personnes âgées sont plus à risque de développer une forme neuro-invasive lors d'infection par le VWN (Montgomery and Murray 2015). Une des raisons à cela peut être une défaillance de leur système immunitaire. En effet, des études ont montré que le vieillissement impacte le phénotype et les fonctions de plusieurs cellules immunitaires (Montgomery and Shaw 2015) comme les neutrophiles, les monocytes/macrophages ou les cellules dendritiques.

Les **neutrophiles** perdent certaines de leurs fonctions en vieillissant. Ces cellules sont les premières cellules immunitaires présentes sur le site de l'infection. Une fois sur site elles peuvent agir par différents mécanismes comme générer des espèces réactives oxygénées (ROS) ou encore relarguer des granules contenant des enzymes protéolytiques ou peptides anti-microbiens. Plusieurs fonctions des neutrophiles sont impactées lors du vieillissement, comme le chimiotactisme, la phagocytose ou encore l'apoptose (Amulic et al. 2012). Lors de l'infection au VWN, les neutrophiles servent de réservoir de réplication mais participent également à la clairance virale dans la suite de l'infection (Bai et al. 2010). Bien que fortement impliqués dans la réplication du VWN, l'impact de l'âge sur les neutrophiles lors d'infection au VWN reste relativement peu documenté.

Les **macrophages** jouent également un rôle important dans les premières étapes de l'infection au VWN, ils permettent la production de nombres de cytokines impliquées dans la réponse immunitaire comme les IFN de type I, le TNF α ou encore l'IL-8. Une étude récente a permis de montrer que contrairement aux patients jeunes, chez les patients âgés, l'expression du TLR-3 est élevée lors d'infection au virus WN (Kong et al. 2008) ce qui conduit à une augmentation de la sécrétion de cytokines comme IL-6 et IFN-B1. L'augmentation de ces cytokines peut être impliquée dans un accroissement de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique, ce qui peut expliquer l'induction de la pathogénicité du virus chez les personnes âgées (Wang et al. 2004).

A la suite d'une infection au VWN, les **cellules dendritiques** des personnes âgées ont tendance à avoir une production d'IFN α et d'IFN β diminuée probablement due à une défaillance dans la phosphorylation de STAT1 (Qian et al. 2011).

Les **cellules « Natural Killer »** sont également un moyen de défense immédiat permettant de faire face aux premières étapes de l'infection. Chez les personnes âgées, ces cellules présentent une induction du marqueur CD57, une diminution de l'expression de DNAM-1, NKp30 et NKp46 (Solana et al. 2014).

L'ensemble des modifications apportées aux cellules de l'immunité innée chez les personnes âgées impactent la réplication et donc la pathogénicité du virus. Cependant, le système immunitaire adaptatif peut également être touché, notamment par une diminution de la quantité de lymphocytes T et B, ainsi qu'une dérégulation de la sécrétion de cytokines conduisant par exemple à une augmentation du titre viral dans le cerveau chez la souris (Brien et al. 2009).

1.9. Réponse immunitaire chez l'oiseaux

Le développement de la réponse immunitaire chez le modèle mammifère ou chez le vecteur moustique est précisément décrit au travers de voies de signalisations telles que la voie Jak/STAT (moustique) ou voie de l'IFN de type I (mammifère). En revanche, l'étude de la réponse immunitaire chez l'hôte aviaire s'est principalement concentrée sur la production des anticorps, ou encore le rôle de la 2'-5'-oligoadénylate synthase.

En effet, l'évaluation de la réponse immunitaire chez un modèle aviaire a été principalement réalisée sur les poulets domestiques (*Gallus gallus domesticus*) ou encore chez le moineau domestique (*Passer domesticus*). Les résultats obtenus montrent que tout comme chez le modèle mammifère, lorsque la virémie diminue, la quantité d'anticorps augmente et que les premiers symptômes ne sont observés qu'une fois la phase virémique terminée. Plusieurs études montrent notamment la persistance du virus au sein de son hôte aviaire notamment, suggérant la possibilité d'une hibernation du virus au sein de son hôte aviaire (Wheeler et al. 2012) (N. Nemeth et al. 2009). Aussi, Nemeth *et al.*, montrent que des oiseaux domestiques précédemment infectés par West Nile restent protégés contre une nouvelle infection, et que les anticorps produits permettent une protection jusqu'à plusieurs mois après infection (jusqu'à 36 mois) (N. M. Nemeth, Oesterle, and Bowen 2009).

Aussi, tout comme l'Homme ou le cheval, les oiseaux utilisent la 2'-5'-oligoadénylate synthase (OAS) afin de répondre à l'infection au VWN. L'OAS détecte l'ARN double brin du virus, et synthétise des 2'-5'-oligoadénylates. Les 2'-5'-oligoadénylates vont alors se lier à la RNase L inactive, afin de l'activer permettant alors le clivage de l'ARN viral (Silverman 2007) inhibant l'avancée du virus et provoquant l'apoptose, un des mécanismes de défense antivirale (Castelli et al. 1998).

Enfin, il existe une protection croisée chez les oiseaux entre différents flavivirus. En effet, des oiseaux domestiques challengé avec le virus de l'encéphalite de St Louis en premier lieu puis par une infection au VWN présentent des anticorps permettant de combattre l'infection au VWN.

	Mosquito	Bird	Horse	Human
RNAi response	Yes	Unknown	Unknown	Not utilized
Interferon-mediated response	Possibly, using Vago	Unknown	Yes	Yes
Apoptosis	Yes	Unknown	Yes	Yes
OAS response	Absent	Yes	Yes	Yes
Passive immunity	Absent	Yes	Yes	Yes

Tableau 1. Comparaison simplifiée des différents mécanismes de réponse immunitaire décrits chez le vecteur moustique, chez l'oiseau, ou chez les mammifères tels que le cheval et l'Homme.

(Ahlers and Goodman 2018)

2. Partie 2 : Le vecteur moustique

2.1. Classification phylogénétique

Les moustiques font partie du règne animal, dans l’embranchement du phylum des arthropodes (présence de pattes articulées), dans la classe des insectes (trois paires de pattes), l’ordre des diptères (une seule paire d’aile), et le sous-ordre des nématocères (corps allongé). A leur niveau taxonomique, les moustiques constituent la famille des Culicidae (Fig.20).

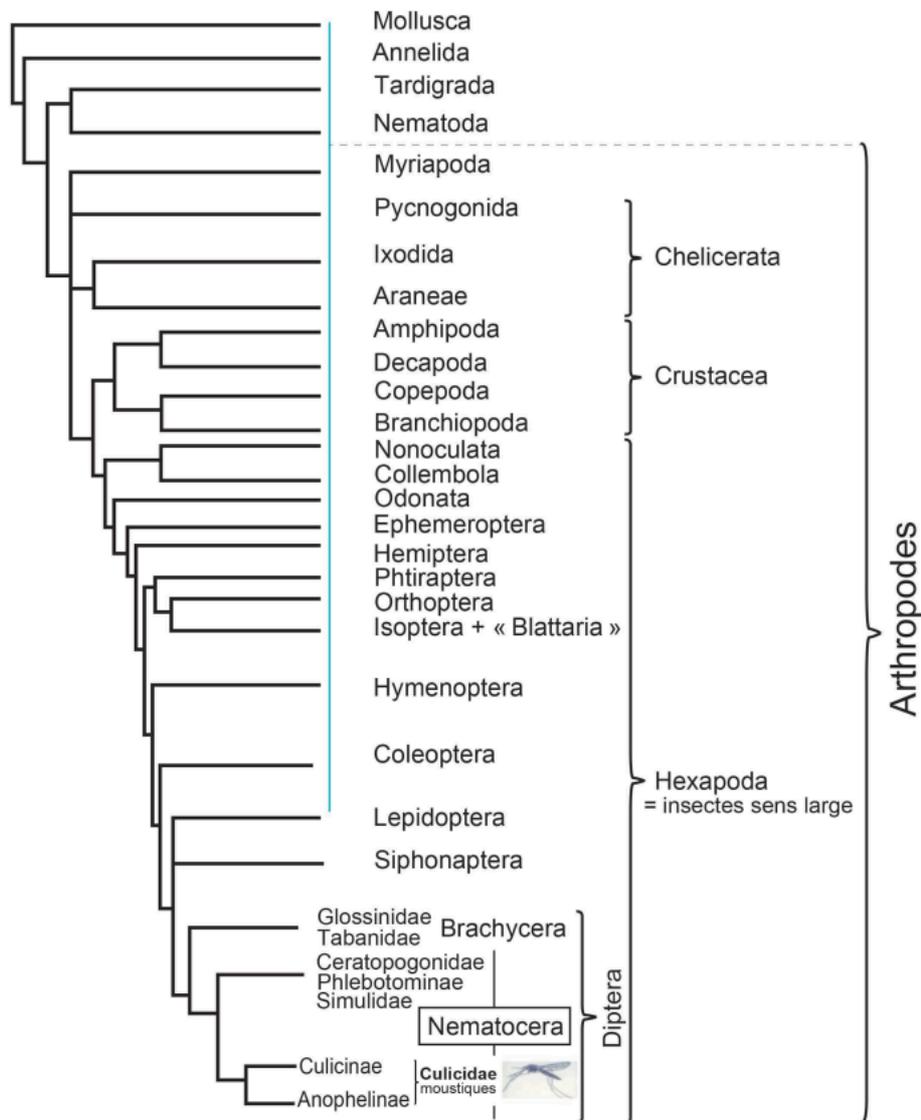


Figure 20. Classification phylogénétique des Culicidae.

(Meusemann et al, 2010)

2.2. Cycle de développement

Le VWN étant transmis principalement par les espèces de moustiques du genre *Culex*, c'est le cycle de développement de ce genre qui sera décrit. Le cycle de vie d'un *Culex* débute dès lors que la femelle (fécondée et gorgée de sang) pond ses œufs à la surface de l'eau (Fig.21 et 22). Environ 150 à 200 œufs sont relargués par ponte sous forme d'un radeau. À la suite de cela, chacun des œufs va donner naissance à une larve. Il existe 4 stades larvaires marqués par des mues successives. A la suite du dernier stade larvaire, la larve évolue en nymphe qui a son tour va éclore pour laisser place à un moustique adulte. On estime un sexe ratio mâles/femelles de 1 :1 à chacune des pontes.

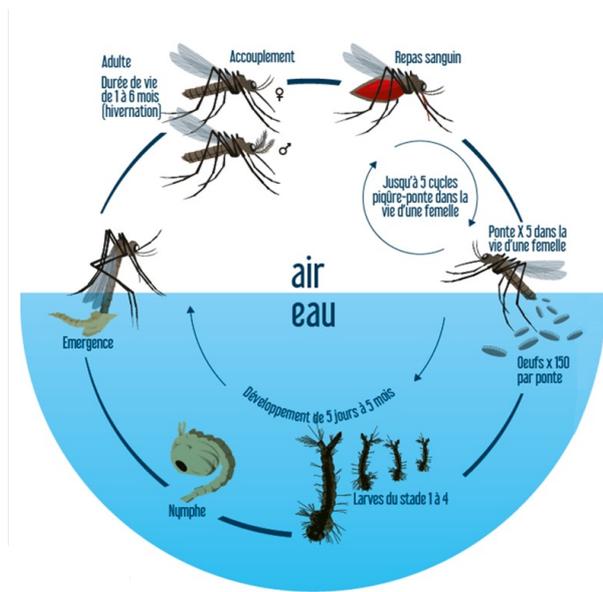


Figure 21. Cycle de vie d'un moustique du genre *Culex*.

<https://www.eidatlantique.eu/>



Figure 22. Image d'une femelle *Culex pipiens* en train de pondre ses œufs à la surface de l'eau.

Photographie de Sean McCann (Université de Floride).

Le développement des larves s'effectue dans l'eau et leur respiration est permise par un siphon respiratoire qui se trouve à l'extrémité de l'abdomen (Fig.23). Que ce soit au stade larvaire ou au stade adulte, le moustique a un corps divisé en trois segments, la tête, le thorax et l'abdomen. A la suite des quatre stades larvaires, la larve atteint le stade de pupa. Aux stades larvaires, les larves se nourrissent de divers aliments retrouvés dans l'eau propre ou souillée. A partir du stade « pupa », l'individu ne dispose pas d'appareil alimentaire externe et ne se nourrit pas.

2.3. Anatomie d'un moustique

2.3.1. Anatomie de la larve à l'adulte

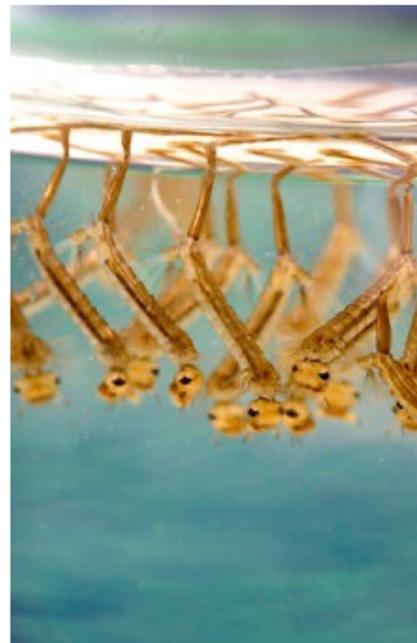
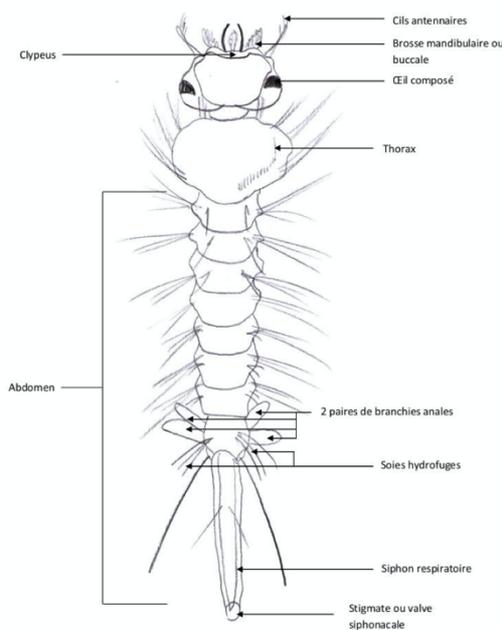


Figure 23. Anatomie d'une larve de moustique du genre Culex.

La larve est divisée en trois segments, la tête, le thorax et l'abdomen. <https://www.fichier-pdf.fr/2012/07/11/larve-de-culex/>

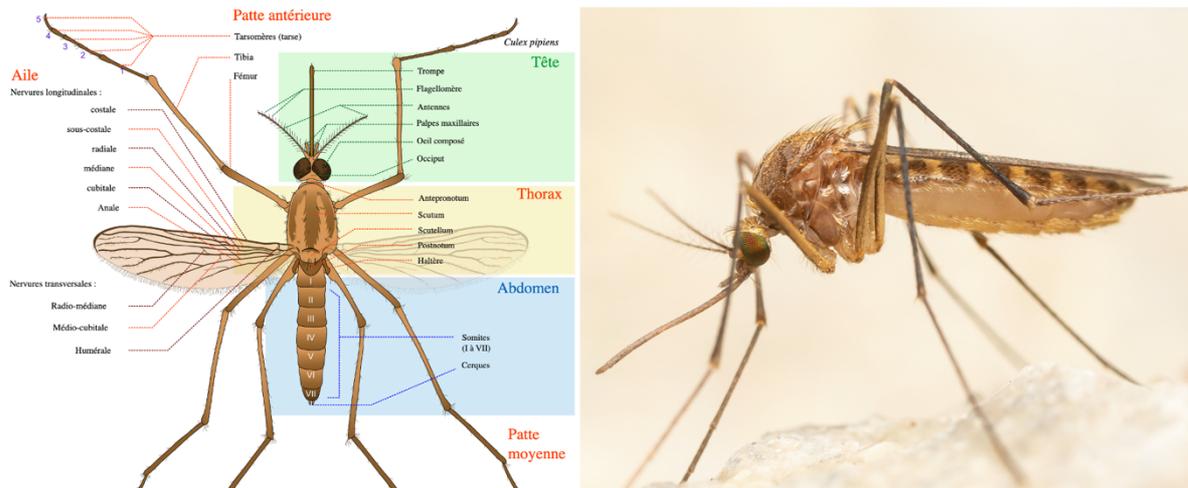


Figure 24. Anatomie du *Culex pipiens* adulte femelle.

Le corps est divisé en trois segments, la tête, le thorax et l'abdomen. Au niveau du thorax sont reliées trois paires de pattes et une paire d'ailes.

2.3.2. Identification morphologique d'un *Culex pipiens*

L'identification des différentes espèces peut parfois paraître laborieuse tant elle nécessite l'observation fine de caractéristiques morphologiques, notamment au niveau des ailes, identifiables sous loupe binoculaire. Dans les cas les plus complexes, seule une identification par RT-qPCR ciblée sur un gène spécifique de l'espèce est envisageable pour discerner une espèce d'une autre. Ci-dessous sont représentées les caractéristiques morphologiques permettant l'identification d'un *Cx. pipiens* (Fig.25).

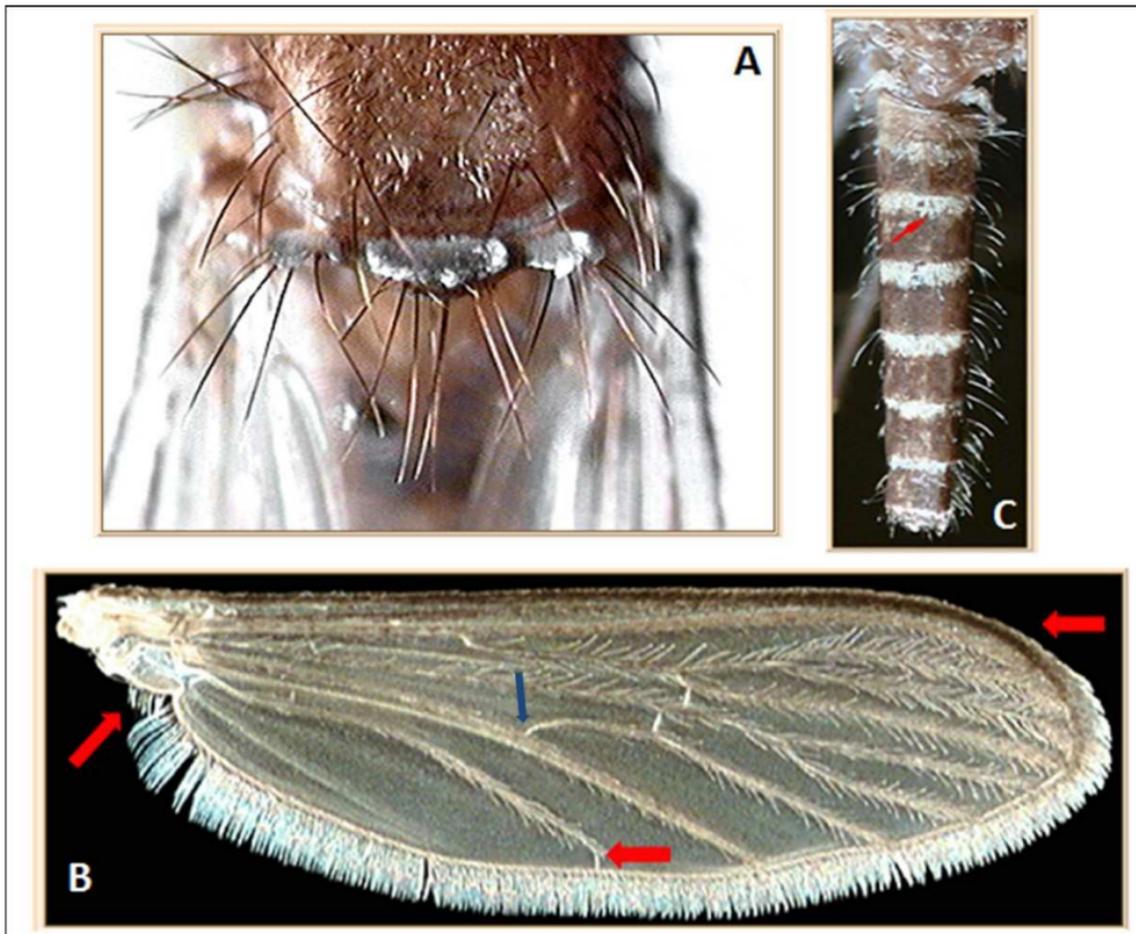


Figure 25. Caractéristiques morphologiques du *Culex pipiens*.

A : Scutellum trilobé. B : Caractéristiques des ailes : poils (flèche gauche), veine costale foncée (flèche à droite), apex de la veine 1-A (flèche rouge au milieu). C : bandes claires sur les tergites. (IRD, 1999)

2.4. Les espèces vectrices du VWN à travers le monde

La transmission des arbovirus est dépendante de l'écologie de leurs vecteurs, elle-même dépendante des conditions environnementales et des hôtes disponibles. Le premier isolement du VWN sur un vecteur moustique a été réalisé sur un moustique du genre *Culex* en 1953 (Taylor et al. 1953). *Culex pipiens* est l'espèce qui représente le membre type du groupe Pipiens. Dans le groupe Pipiens sont présentes plusieurs espèces de *Culex* responsables de la transmission d'agents pathogènes. On peut y retrouver les *Cx. pipiens pipiens*, les *Cx. pipiens molestus*, les *Cx. quinquefasciatus*, les *Cx. pipiens pallens*, les *Cx. australicus*, ainsi que les *Cx. globocoxitus*. La capacité des *Cx. pipiens* à s'adapter facilement aux espaces altérés par l'Homme leur permet de disposer d'une large aire de répartition. Les espèces du groupe des Pipiens se retrouvent sur la quasi-totalité du globe et constituent un des groupes les plus importants pour la transmission du VWN (Fig.26)

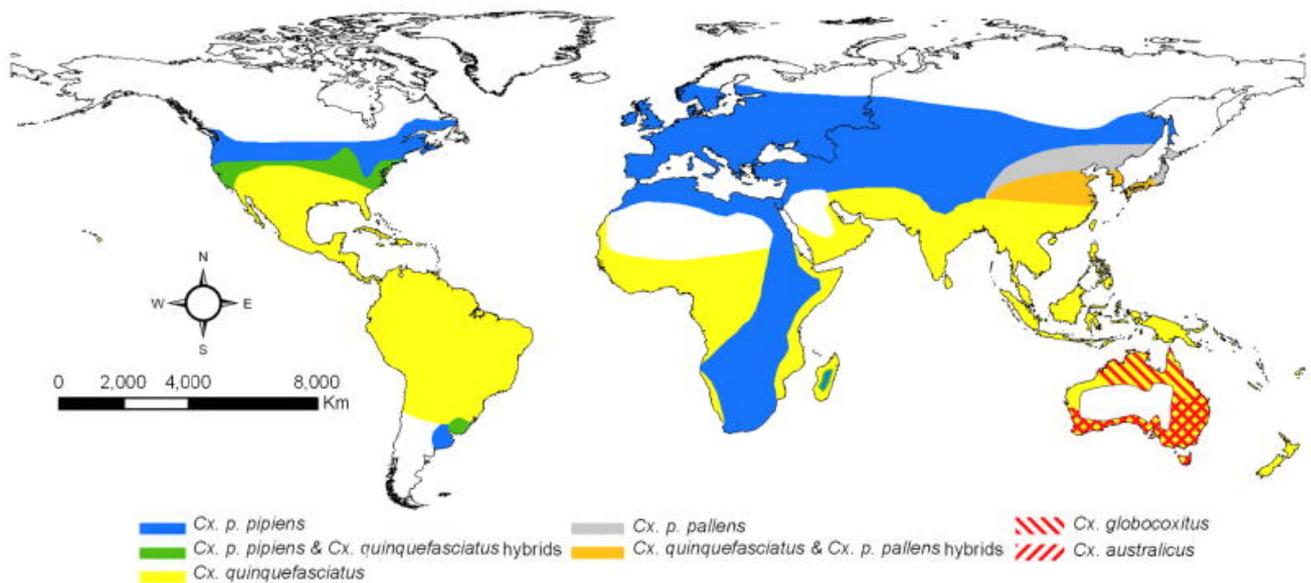


Figure 26. Répartition des *Cx. pipiens* à la surface du globe.

(Farajollahi et al. 2011)

2.4.1. Les espèces vectrices sur le continent américain

Sept espèces de *Culex* sont prédominantes aux Etats-Unis : *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. erraticus*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarus* et *Cx. tarsalis*. Pour ces sept espèces, des études ont permis d'identifier leur possible rôle dans la transmission du VWN qu'il s'agisse de collectes sur le terrain ou d'infections en laboratoire. Toutefois, il est important de souligner que lors de la collecte sur le terrain les résultats rendent compte de la capacité vectorielle tandis que les infections en laboratoire rendent compte de la compétence vectorielle. En effet, dans la nature, la transmission du virus est largement impactée par des facteurs écologiques comme les conditions météorologiques.

Les préférences trophiques du *Cx. erraticus* varient selon la géographie et selon les saisons. En Alabama, le *Cx. erraticus* semble préférentiellement se nourrir sur les oiseaux (Oliveira et al. 2011). Au contraire, dans le sud de la Floride, le *Cx. erraticus* se nourrit préférentiellement sur les animaux ectodermes comme les reptiles (Bingham et al. 2014). Malgré sa préférence trophique pour les espèces aviaires, le *Cx. erraticus* n'est pas considéré comme un vecteur majoritaire du VWN. Toutefois, des analyses sur le terrain ont permis de trouver des *Cx. erraticus* infectés naturellement par le VWN, notamment en Floride (Hribar et al. 2004), au Texas (Bolling, Kennedy, and Zimmerman 2005), en Alabama (Cupp et al. 2007), au Tennessee (Cupp et al. 2007) et en Louisiane (Unlu et al. 2010).



Figure 27. Photographie d'un *Cx. erraticus* prenant son repas sanguin sur un *Anolis vert*, *Anolis Carolinenses* (reptile, de la famille des Dactyloidae).

Photographié par Nathan Burkett-Cadena, Université de Floride.

Des études menées en Floride pour évaluer la transmission vectorielle du VWN et du virus de l'encéphalite de Saint Louis ont permis de capturer des *Cx. nigripalpus* naturellement infectés par le VWN. L'objectif de l'étude était d'exposer en parallèle ces moustiques à des poulets, et de chercher la présence d'anticorps anti-VWN chez ces poulets. Un résultat positif a permis de mettre en évidence la compétence vectorielle du *Cx. nigripalpus* vis-à-vis du VWN (Vitek et al. 2008). De plus, des infections expérimentales en laboratoire ont permis de confirmer sa compétence vectorielle vis-à-vis du VWN (Mores et al. 2007).

En 2000, lors d'une étude de surveillance du VWN dans le Connecticut (Andreadis, Anderson, and Vossbrinck 2001), plusieurs piégeages de moustiques ont été réalisés entre début Juin et fin Octobre sur 148 sites de capture présents dans une aire de répartition où une forte mortalité aviaire ainsi que des cas équinus avaient été recensés. L'analyse par RT-qPCR de plus de 130 000 moustiques femelles a permis d'identifier 4 espèces infectées par le VWN : *Cx. pipiens* (5 individus positifs sur 102 individus), *Cx. restuans* (4 individus positifs sur 37 individus), *Cx. salinarius* (2 individus positifs sur 11 individus), *Cs. melanura* (2 individus positifs sur 96 individus). D'autres études terrain aux Etats-Unis ont permis de mettre en évidence la présence du virus WN chez les espèces de *Cx. quinquefasciatus* (Crockett et al. 2012) et *Cx. tarsalis* (Goldberg, Anderson, and Hamer 2010).

2.4.2. Les espèces porteuses du virus en Europe

Cx. pipiens est l'espèce la plus présente et vectrice de West Nile en Europe. L'année 2018 fût l'année la plus marquée par la présence de West Nile en Europe. C'est notamment en 2018 que le virus a émergé pour la première fois en Allemagne (Kampen et al. 2020). En 2019, la détection par RT-qPCR a permis d'identifier *Cx. pipiens pipiens* et *Cx. pipiens molestus* comme infectés par le virus WN et donc potentiellement vecteurs responsables de sa dissémination en Allemagne. De plus, la souche retrouvée dans ces espèces est la même que celle circulant en 2018, suggérant la possible hibernation du virus au sein de ces espèces de moustiques en Allemagne.

En France, le virus WN circule particulièrement en Camargue. Sa présence au sein d'un *Cx. modestus* a été mise en évidence la première fois en 1964, juste après la première émergence du virus en Camargue en 1962 (Hannoun et al. 1964). Après 35 ans sans épidémie, le retour du virus en 2000 est marqué avec notamment 76 cas équins dont 21 fatals mais cependant aucun cas chez l'Homme et aucune mortalité aviaire anormale (Murgue, Murri, Zientara, et al. 2001). Les années suivantes, plusieurs cas ont été détectés en Camargue et alentours (Surveillance de l'infection équine à VWN en France. Bilan 2000-2007) avec notamment sept cas autochtones chez l'Homme en 2003.

En Grèce, la surveillance du virus a permis de mettre en évidence une forte circulation virale entre 2010 et 2015, notamment par la présence de cas humains et aviaires ou encore de moustiques retrouvés infectés. Ainsi, les années 2010 et 2012 ont été marquées dans ce pays par une incidence très forte chez l'Homme (262 et 161 cas respectivement sur ces deux années) et une prévalence élevée d'infection chez le moustique (212 moustiques retrouvés positifs à l'infection sur 2112 moustiques testés) (Gossner et al. 2017).

En Italie, le gouvernement italien a mis en place un plan de surveillance intégré reposant sur le suivi de chevaux, des moustiques, de volailles domestiques et d'humains à partir de 2001 afin de détecter rapidement les émergences (Fig.30) (Toma et al. 2008). La surveillance entomologique s'est basée sur la capture d'espèces à différents points de collecte, par des méthodes de piégeage comme le piège-CDC (Fig.28) ou encore les pièges pour femelles gravides (Fig.29).



Figure 28. Exemple de fonctionnement d'un piège CDC.

A gauche de l'image, le moteur (aspirant) est relié à une batterie permettant le fonctionnement du moteur. Une fois présent au niveau de l'ampoule lumineuse (près du moteur) le moustique est aspiré et maintenu en vie dans l'espace de stockage (ici constitué d'une bouteille en plastique de 5L, coupée afin de permettre une aération de l'espace de stockage, le tout recouvert de papier absorbant humidifié, recouvert d'aluminium pour permettre un bon maintien de l'humidité dans l'espace de stockage et donc une survie des moustiques capturés). L'attraction du moustique est permise non seulement par l'ampoule lumineuse, mais essentiellement par le dégagement de CO_2 , issu de la fonte de carboglace (dans le récipient bleu). Le récipient bleu est perforé, ce qui entraîne une diffusion lente du CO_2 autour du piège. Ce type de piège cible les femelles, en quête d'une proie à piquer, afin de permettre la maturation des œufs. Le CO_2 mime la présence d'un mammifère. Photo prise par Lise Fiacre, 2022, à Baie-Mahault, Guadeloupe.

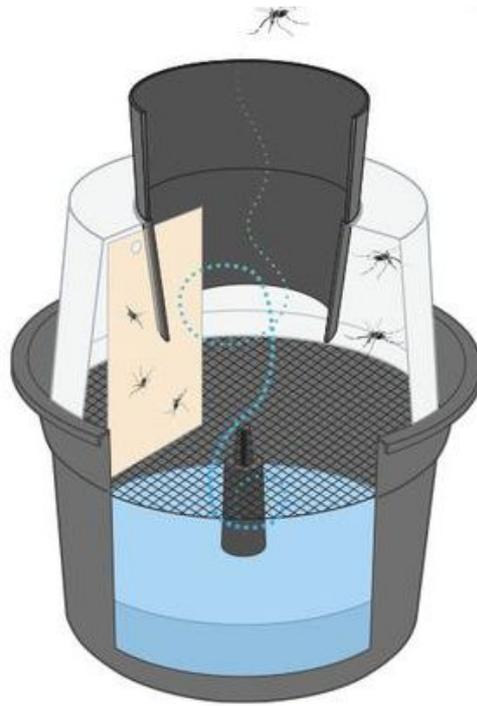


Figure 29. Exemple de piège femelle gravide, aussi nommé piège-pondoir ou piège oviposition.

Dans ce cas, ce sont les femelles gravides qui sont ciblées au moment où elles souhaitent pondre. Elles sont attirées par l'eau stagnante afin de pondre. Dans l'image ci-dessus, les moustiques, après avoir pondu sont coincés dans des bandes collantes. Dans d'autre cas, la récupération des femelles gravides à la surface de l'eau peut se faire via un système d'aspiration maintenu par un moteur et une batterie électrique. Image Biogents.

Cela a permis de mettre en évidence la circulation du virus au sein de trois espèces : *Cx. pipiens* principalement, *Oc. Caspius* et *Cx. modestus* ; le femelles *Cx. pipiens* et *Oc. Caspius* étant les plus abondantes lors des récoltes (Fig.30).

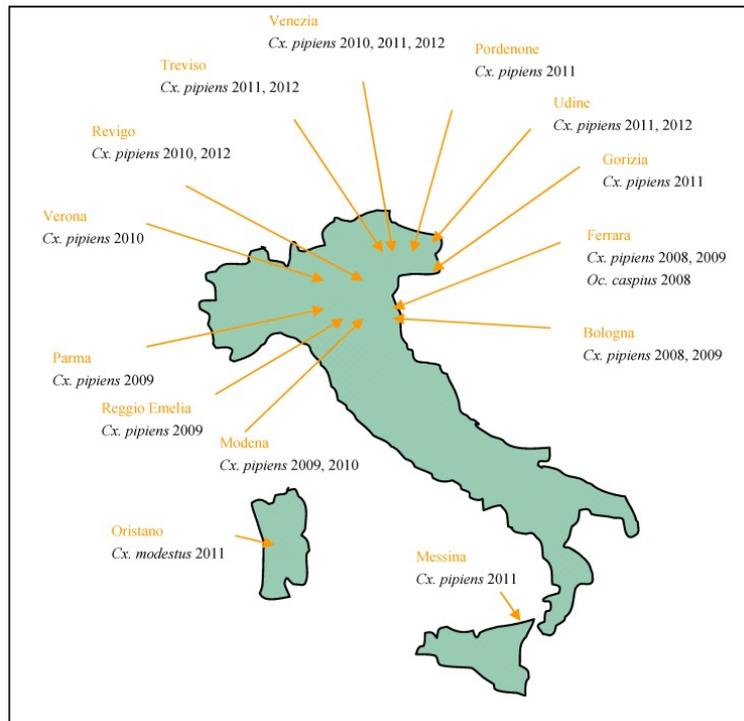


Figure 30. Répartition des espèces de moustiques retrouvées positives en RT-qPCR pour détection du VWN en Italie, entre 2008 et 2012.

(Engler et al. 2013)

2.4.3. Les espèces porteuses du virus en Asie

En Asie, les principales espèces vectrices sont *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, et *Cx. vishnui* (Hubálek and Halouzka 1999). La surveillance du virus en Inde a également permis de mettre en évidence la présence du virus au sein d'autres sous-genres/genres comme *Culex whitmorei*, *Culex pseudovishnui* ainsi que *Mansonia uniformis* (Khan et al. 2016).

2.4.4. Les espèces porteuses du virus en Afrique

L'Afrique constitue le berceau du VWN, où il a été identifié pour la première fois en Ouganda. Il a ensuite été isolé en Afrique en 1968 sur un pool de 215 *Culex* dans la région de Djanet (Pilo-Moron, Vincent, and Le Corroller 1970). Le VWN a été isolé plusieurs fois dans le Nord de l'Afrique notamment au Maroc en 1996 à partir d'un encéphale de cheval (El Harrack, Le Guenno, and Gounon 1997), ou encore en Tunisie en 1997, à partir d'un prélèvement chez l'Homme (Bahri et al. 2011) ou encore en 2003 au Maroc à partir d'un cheval (E. Sotelo et al. 2009). La principale espèce vectrice en Afrique est *Cx. univittatus*, (McIntosh et al. 1967) bien que

d'autres espèces, comme *Cx. neavei*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. perexiguus* (M'ghirbi Y et al. 2023) ou encore *Ae. circumluteolus* se sont également révélées positives au VWN (Jupp 2001).

La diversité des espèces vectrices potentielles du VWN selon les zones géographiques est encore incomplètement connue à ce jour. Bien que les principales espèces vectrices ou porteuses de West Nile aient été rapportées ci-dessus, le virus WN peut se retrouver dans nombre d'espèces vectrices de type moustique, certes principalement du genre *Culex* mais parfois du genre *Aedes*, ou parfois même il a été retrouvé chez des tiques (Tableau 2). Toutefois, les tiques sont aujourd'hui largement moins concernées par l'infection au VWN, que les moustiques. Néanmoins, la présence de tiques infectées sur des oiseaux migrateurs pourrait jouer un rôle dans la diffusion longue distance du virus, tout comme les mouvements des moustiques.

Species	No.	Countries
Mosquitoes		
<i>Culex antennatus</i> ^a	6	Egypt, Madagascar
<i>decens</i> group	8	Madagascar
<i>ethiopicus</i>	1	Ethiopia
<i>guiarti</i>	1	Côte d'Ivoire
<i>modestus</i>	3	France, Russia
<i>neavei</i>	4	Senegal, South Africa
<i>nigripes</i>	1	Central African Republic
<i>peregrinus</i>	1	Israel
<i>perfuscus</i> group	3	Central African Republic, Senegal
<i>pipiens</i> ^a	7	South Africa, Egypt, Israel, Romania, Czechland, Bulgaria ^b
<i>poicilipes</i>	29	Senegal
<i>pruina</i>	1	Central African Republic
<i>quinquefasciatus</i> ^a	7	India, Pakistan, Madagascar
<i>scottii</i>	1	Madagascar
<i>theileri</i> ^a	4	South Africa
<i>tritaeniorhynchus</i> ^a	3	Pakistan, India, Madagascar
<i>univittatus</i> ^a	51	Egypt, Israel, South Africa, Madagascar
<i>vishnui</i> ^a group	6	India, Pakistan
<i>weschei</i>	1	Central African Republic
sp.	3	Egypt, Algeria, Central African Republic
<i>Coquillettidia metallica</i>	1	Uganda
<i>microannulata</i>	1	South Africa
<i>richiardii</i>	5	South Russia, Bulgaria ^b
<i>Mansonia uniformis</i>	1	Ethiopia
<i>Aedes aegypti</i> ^a	1	Madagascar
<i>africanus</i>	1	Central African Republic
<i>albocephalus</i>	35	Madagascar
<i>albothorax</i>	1	Kenya
<i>cantans</i>	7	Slovakia, Ukraine, Bulgaria ^b
<i>caspius</i> ^a	1	Ukraine
<i>circumluteolus</i>	2	South Africa, Madagascar
<i>exrucians</i>	1	Ukraine
<i>juppi+caballus</i>	1	South Africa
<i>madagascarensis</i>	1	Madagascar
<i>vexans</i>	3	Senegal, Russia
<i>Anopheles brunnipes</i>	1	Madagascar
<i>coustani</i>	1	Israel
<i>maculipalpis</i>	1	Madagascar
<i>maculipennis</i>	3	Portugal, Ukraine
<i>subpictus</i>	1	India
sp.	1	Madagascar
<i>Mimomyia hispida</i>	8	Senegal
<i>lacustris</i>	4	Senegal
<i>splendens</i>	6	Senegal
sp.	2	Senegal
<i>Aedeomyia africana</i>	1	Senegal
Soft ticks		
<i>Argas hermanni</i> ^a	3	Egypt
<i>Ornithodoros capensis</i> ^a	5	Azerbaijan
Hard ticks		
<i>Hyalomma marginatum</i>	5	Astrakhan, Azerbaijan
<i>detritum</i>	1	Turkmenistan
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	1	Azerbaijan
<i>muhsamae</i>	1	Central African Republic
<i>Amblyomma variegatum</i>	1	Central African Republic
<i>Dermacentor marginatus</i> ^a	1	Moldavia

^aExperimental transmission of the virus also demonstrated.

^bDetected in mosquitoes by immunofluorescence assay.

Tableau 2. Isolement du VWN à partir d'arthropodes hématophages.

NB : la présence du virus au sein de l'espèce ne témoigne en rien de sa compétence vectorielle vis-à-vis du virus, simplement du fait que l'arthropode se soit nourri sur un animal porteur du virus. (Hubálek and Halouzka, 1999)

2.5. Notion de compétence vectorielle, capacité vectorielle et période intrinsèque d'incubation

2.5.1. Compétence vectorielle

Pour transmettre un agent pathogène, il est nécessaire que le moustique soit en mesure d'ingérer l'agent infectieux lors de la prise d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Puis, l'agent pathogène doit se répliquer au sein des cellules du tractus digestif du moustique, avant de franchir la barrière intestinale et de se disséminer dans le reste du corps du moustique. Par le biais de l'hémocoèle, l'agent atteint les glandes salivaires, où se déroule un autre cycle de réplication, afin d'être transmis à un nouvel hôte lors d'un repas sanguin. Les passages de la barrière intestinale et des glandes salivaires et donc la présence du virus dans la salive constituent des étapes clés pour la transmission du virus WN. Si toutes les étapes sont franchies, le moustique devient alors vecteur du virus. L'ensemble de ces étapes est regroupé sous le terme de compétence vectorielle (Rodhain 1991). C'est une variable dépendante de plusieurs facteurs tels que le génome du moustique, impactant la présence/absence de récepteurs spécifiques au virus tout au long de sa réplication dans l'insecte ; son microbiote ; ou encore l'environnement physico-chimique intrinsèque nécessaire au virus pour permettre la bonne réplication virale au sein du vecteur (de la Fuente et al. 2017). L'infection d'un moustique par le VWN est initiée lors de la prise de repas sanguin sur un hôte infecté, mais elle peut également être permise par une transmission verticale au sein de l'espèce (Baqar et al. 1993). Bien que compliquée à estimer, plusieurs équipes se sont intéressées à la quantité de virus transmise lors d'un repas sanguin d'un moustique infecté à un hôte sain notamment via des méthodes expérimentales d'infection comme l'inoculation intrathoracique par aiguille ou le gorgement sur une membrane ou un hôte infecté. L'avantage de l'inoculation intrathoracique est que cela permet d'obtenir un bon rendement en termes d'individus infectés. Cela permet également d'injecter une dose équivalente de virus à chacun des moustiques, quand la dose d'infection est plus aléatoire lors de gorgement *in vivo* permet. L'infection par inoculation intrathoracique permet donc une meilleure standardisation des conditions d'infection mais reste une méthode artificielle puisqu'elle contourne une des étapes clés qui est le passage de la barrière intestinale, limitant ainsi les données concernant la dissémination virale au sein du vecteur. Ces tests ont permis d'estimer la quantité de virus transmis lors d'un repas sanguin d'un moustique infecté vers un hôte sain à une moyenne comprise entre $10^{1,2}$ et $10^{4,3}$ PFU selon les espèces de moustiques (Vanlandingham et al. 2004). Cependant lors de la prise d'un repas sanguin, une partie de la salive du moustique est ré-ingérée (Kebaier and Vanderberg 2006). Pour s'affranchir de ce biais M. Styer *et al.*, ont réalisé une méthode permettant d'estimer *in vivo* la quantité de virus délivrée par le moustique *Cx. pipiens*, *Cx. tarsalis*, ou certaines espèces d'*Aedes* (*Ae. triseriatus* et *Ae. japonicus*) chez l'hôte lors d'un repas sanguin. Leurs résultats ont permis d'estimer que *Cx. pipiens* délivre entre $10^{5,9}$ PFU lors de son repas sanguin, *Cx. tarsalis* $10^{4,3}$ PFU, *Ae. triseriatus* $10^{3,6}$ PFU et *Ae. japonicus* $10^{4,7}$ PFU. Contrairement à ce qui était attendu, ces résultats montrent que dans le cas de *Culex tarsalis*, l'estimation *in vivo* de la quantité de virus transmise est 600 fois plus élevée que lorsque la quantité est estimée *in vitro* (Styer et al. 2007). Connaître les espèces compétentes pour un agent

pathogène ainsi que la quantité de virus délivrée lors du repas sanguin d'un vecteur compétent sont des approches essentielles pour connaître la dynamique d'infection moustiques-hôtes réservoirs et anticiper les futures épidémies.

2.5.2. Capacité vectorielle

La capacité vectorielle se définit comme l'ensemble des facteurs biologiques mais également bioécologiques, influençant la transmission du virus. Cela regroupe donc la compétence vectorielle mais également l'abondance des espèces, la longévité, les préférences trophiques, le climat ou encore la répartition géographique (de la Fuente et al. 2017). Ainsi, la capacité vectorielle peut notamment être influencée par la répartition des moustiques elle-même influencée par le réchauffement climatique (Hemmer et al. 2018) (El-Sayed and Kamel 2020), l'urbanisation (Rochlin et al. 2016), le fractionnement, l'utilisation d'insecticides et la survenue de la résistance aux insecticides, etc... La capacité vectorielle peut être calculée via la formule ci-dessous (Zimler and Alto 2021) :

$$C = [ma^2 (I^*T)p^n] / -\ln(p)$$

où m est la densité de vecteur par rapport à l'hôte, a est la probabilité que le vecteur se nourrisse sur l'hôte un jour, p la probabilité que le vecteur survive, n la durée de la période extrinsèque d'incubation, I le taux d'infection et T le taux de transmission (soit la compétence vectorielle) et C la capacité vectorielle.

Contrairement au gorgement artificiel sur membrane en laboratoire qui surestime la possibilité de transmission d'un agent pathogène par son vecteur moustique (mise en contact rapprochée avec le gorgeur infecté, doses optimales de virus), la capacité vectorielle prend en compte de nombreux facteurs afin de rendre compte de la possibilité de circulation d'un agent pathogène en conditions réelles. L'ensemble des variables impliquées sont essentielles afin de comprendre et d'anticiper l'émergence ou la ré-émergence d'agents pathogènes transmis par les moustiques, telle que le VWN.

2.5.3. Période extrinsèque d'incubation

La période extrinsèque d'incubation (PEI) correspond à la durée écoulée entre le moment où le moustique acquiert l'agent pathogène et le moment où il est retrouvé dans la salive. Dans le cas du virus de la fièvre jaune (YFV) cette période varie entre 9 à 12 jours (Bauer and Hudson 1928). Dans le cas du virus Zika, la PEI est de 16,2 jours post-infection pour *Aedes albopictus* et de 18,2 pour *Aedes aegypti*, montrant que la PEI dépend non seulement des moustiques mais également des agents pathogènes qu'ils transmettent (Zimler and Alto 2021).

Des facteurs abiotiques comme la température, influent également sur la PEI. Le PEI mesurée pour WNV : 5-15 jours comme présenté plus bas.

2.6. Dissémination chez le moustique

La dissémination virale du VWN au sein des moustiques est un cheminement relativement complexe qui a été décrit à partir des années 2000. En effet, en 2004, Girard et al (Girard, Klingler, and Higgs 2004), se sont intéressés à la dissémination spatiale et temporelle du virus après infection orale par le VWN chez les *Cx. pipiens quinquefasciatus*. Par des techniques d'immunofluorescence ils ont mis en évidence qu'après répllication dans les cellules épithéliales intestinales, le virus s'échappe de l'intestin postérieur, et infecte les cellules graisseuses de l'abdomen, le thorax et la tête avant d'infecter les cellules épithéliales de l'intestin antérieur et les muscles. Aussi, il semble que l'infection des ganglions abdominaux et l'infection des glandes salivaires aient lieu en même temps, et font suite à l'infection de l'intestin antérieur. Tant que les ganglions thoraciques ne sont pas infectés, il est peu probable que la dissémination de l'intestin vers les glandes salivaires soit permise. Il semble plutôt que les cellules graisseuses de l'abdomen permettent l'amplification virale, puis l'infection des glandes salivaires. Globalement, le virus semble se retrouver dans l'intestin postérieur immédiatement après le repas sanguin, puis dans les cellules graisseuses de l'abdomen, dans la tête et dans le thorax (3 jours post-infection), et enfin dans l'intestin antérieur et les glandes salivaires dès 5 jours post-infection. Sa présence dans les glandes salivaires, bien que parfois précoce 5 jours après l'infection, est largement plus marquée vers 10 jours post-infection et encore plus marquée à 14 jours post-infection. A ce moment là, si le titre viral dans la salive est suffisamment élevé, le virus peut être transmis lors d'un repas sanguin sur un nouvel hôte (Fig. 31 et 32).

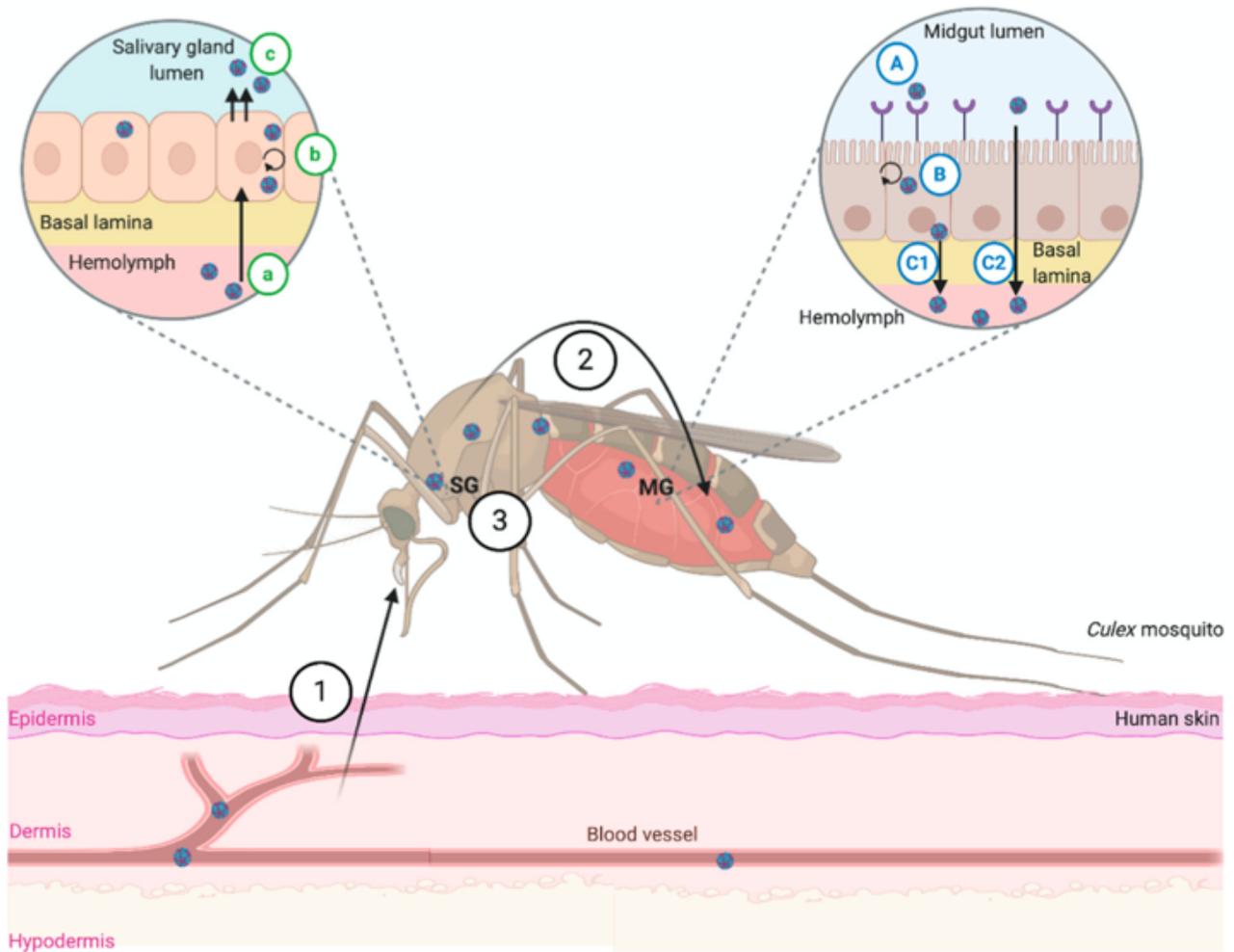


Figure 31. Étapes de dissémination et répllication du VWN chez le moustique.

(1) Prise d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté. (2) Infection au niveau de l'intestin : (A) liaison du virus au niveau des cellules épithéliales par un récepteur – (B) répllication dans les cellules intestinales – (C) passage dans l'hémolymphe par deux voies différentes : (C1) passage direct de la lamina basale à l'hémolymphe, (C2) passage paracellulaire entre les cellules épithéliales. (3) Dissémination du virus aux autres organes comme les glandes salivaires : (a) infection des cellules épithéliales par passage direct des cellules de l'hémolymphe dans les cellules – (b) répllication dans les cellules épithéliales – (c) relargage du virus des cellules épithéliales dans la lumière des glandes salivaires avec ou sans apoptose des cellules épithéliales. (Fiacre et al. 2020)

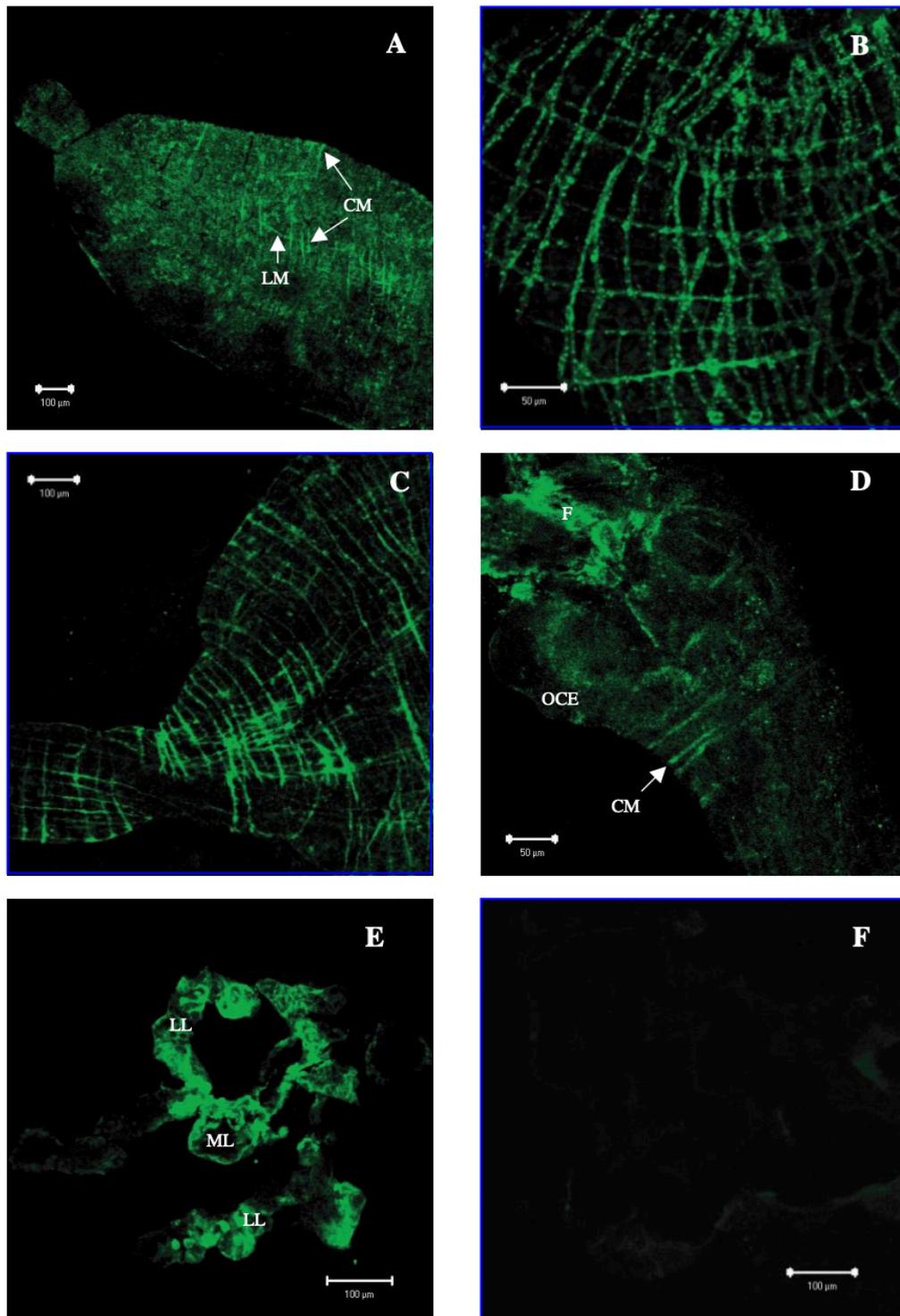


Figure 32. Dissémination virale du VWN chez *Cx. pipiens quinquefasciatus*.

(A) Présence du VWN dans les cellules épithéliales et les muscles de l'intestin postérieur, jour 14 post-infection. CM : muscles circulaires ; LM : muscles longitudinaux (B) Infection des muscles de l'intestin postérieur (circulaires et longitudinaux), 27 jours post-infection. (C) Infection des muscles de l'intestin antérieur, 14 jours post-infection. (D) (F) infection de l'intestin moyen ; (OCE) épithélium externe du cardia ; (CM) muscles circulaires antérieurs ; à 14 jours post-infection. (E) Infection des glandes salivaires, 14 jours post-infection. (ML) lobe médian ; (LL) lobe latéral. (F) Glandes salivaires des moustiques contrôle non infectés, 14 jours post-infection. (Girard, Klingler, and Higgs 2004)

2.7. Impact de *Wolbachia* dans la réplication chez le vecteur

Wolbachia est une bactérie endosymbionte des arthropodes. Elle est associée à une augmentation de la résistance à l'infection virale chez la *Drosophile* par exemple. Une observation similaire a été obtenue pour le virus de la Dengue chez son vecteur *Aedes aegypti*. L'infection par *Wolbachia* w-Mel chez le moustique *Ae. aegypti* inhibe la réplication virale du virus de la Dengue et sa dissémination dans la plupart des individus. A 14 jours post-infection, *Wolbachia* bloque totalement la transmission virale dans 37,7% des moustiques infectés, ce qui est également associé avec une augmentation de l'immunité basale et une augmentation de la survie des moustiques (Bian et al. 2010). Pour West Nile, Glaser *et al.*, (Glaser and Meola 2010) se sont intéressés au rôle de la bactérie dans *Cx. quinquefasciatus*, largement connu comme vecteur du VWN. Les moustiques co-infectés par *Wolbachia* et West Nile présentaient des titres viraux plus faibles et des taux de transmission deux à trois fois plus bas que ceux non colonisés par *Wolbachia*. De même la plupart des moustiques porteurs de *Wolbachia* sont insensibles à l'infection par le VWN. Toutefois, il a été montré que chez *Cx. tarsalis*, un vecteur important du VWN en Amérique du Nord, *Wolbachia* favorise l'infection (Dodson et al. 2014).

2.8. La réponse antivirale chez le vecteur moustique

La plupart des effecteurs de la réponse immunitaire chez les hôtes vertébrés, sont absents chez le moustique. Les mécanismes de régulation de la réponse immunitaire chez le moustique suite à l'infection par le VWN reposent sur trois grands groupes de réponses : la régulation par les petits ARN interférents, les cascades de signalisation antivirales (Toll, Jak/STAT...) ou les processus d'autophagie et d'apoptose.

2.8.1. La régulation par les petit ARN interférents : *exo-siRNA*, *piRNA* et *miRNA*

Les petits ARN sont des ARN endogènes permettant la régulation de l'expression des gènes. Il en existe de trois types : les siRNA, les piRNA et les miRNA. Les invertébrés ne disposent pas des voies IFN de type I et IFN de type III qui sont les voies principales de réponse immunitaire innée à l'infection, mais ils disposent de plusieurs mécanismes de régulation faisant intervenir les petits ARN. Il semble que la voie d'interférence par les ARN exogènes (*exo-siRNA*) soit la voie principale utilisée pour contrôler l'infection virale, cependant, la voie des piRNA a également récemment été décrite chez le moustique.

2.8.1.1. Les siRNA

Les siRNA sont issus du clivage des ARN double brin (dsRNA). Pour les virus ssRNA, des dsRNA sont formés lors du cycle de réplication virale (Ding 2010). Concrètement, la ribonucléase Dicer-2 va reconnaître les dsRNA, puis les cliver en duplex siRNA de 21 nt. Ces duplex sont pris en charge par le complexe RISC, comportant les protéines R2D2, Dicer-2 et Argonaute-2 (Ago-2). Le complexe RISC va sélectionner un brin guide qui va permettre d'identifier l'ARN complémentaire à dégrader, sur la base de l'appariement des bases. Le brin guide va permettre à Ago-2 d'identifier l'ARN viral et de le cliver ce qui conduit à une diminution de la réplication (Rand et al. 2004).

Le domaine DexD/H de Dicer-2 peut également permettre d'induire la protéine Vago chez les cellules de *Culex quinquefasciatus*, entraînant l'activation de la voie Jak/STAT et diminuant l'expression du gène *vir-1*, ce qui conduit également à une diminution de la réplication virale (Paradkar et al. 2012).

2.8.1.2. Les piRNA

Le rôle exact des piRNA (PIWI-interacting RNA) est mal connu, mais il a été montré qu'ils étaient retrouvés suite à l'infection dans différents types cellulaires chez le moustique *Aedes* (Hess et al. 2011) (Vodovar et al. 2012).

Tout d'abord les piRNA sont produits à partir d'une partie du génome viral. Ces piRNA se lient aux protéines PIWI et Aubergine (AUB) (Nishida et al. 2007). Ces piRNA disposent de résidus uridine en 5' de leur séquence. Une fois ces piRNA primaires produits, ils sont amplifiés dans un modèle « ping-pong ». Ils se lient au brin complémentaire viral et engendrent un clivage situé 10 nt en amont des résidus Uridine trouvés en 5' du brin primaire (Brennecke et al. 2007). Le piRNA secondaire dispose d'un résidu Adénine complémentaire du résidu Uridine du piRNA primaire. Le piRNA secondaire est associé à la protéine Argonaute 3 (Ago-3). Les piRNA secondaires se lient alors à des transcrits complémentaires afin d'induire leur clivage au niveau du site Adénine/Uridine. Ceci entraîne la formation de piRNA similaires aux piRNA primaires, permettant une amplification de la réponse PIWI. Bien que leur mécanisme de régulation de la réplication virale reste vague, il a été démontré que le « knock-down » des éléments de régulation des piRNA conduit à une accumulation virale (Morazzani et al. 2012).

2.8.1.3. Les miRNA

Les miRNA sont des petits ARN non codants impliqués dans le contrôle de l'expression génique au niveau post-traductionnel. Le rôle des miRNA est plus largement étudié dans des modèles mammifères, où il a été montré qu'ils peuvent impacter l'infection et les mécanismes cellulaires de réponse à l'infection virale. Ils permettent d'inhiber la traduction ou encore d'initier la dégradation d'ARNm (Cullen 2011). Certains miRNA sont très conservés dans l'évolution, notamment mir-281, mir-184, mir-989, et mir-278, conservés entre les espèces comme *An. Gambiae* (Biryukova, Ye, and Levashina 2014) ou encore *Ae. Aegypti* et *Cx. quinquefasciatus* (Hong et al. 2014). La présence des miRNA varie selon les différentes parties du moustique. Les miRNA chez le moustique sont impliqués dans divers mécanismes tels que l'interaction avec l'agent pathogène, la résistance aux insecticides, le métabolisme ou encore le développement (Fig.33) (Feng et al. 2018).

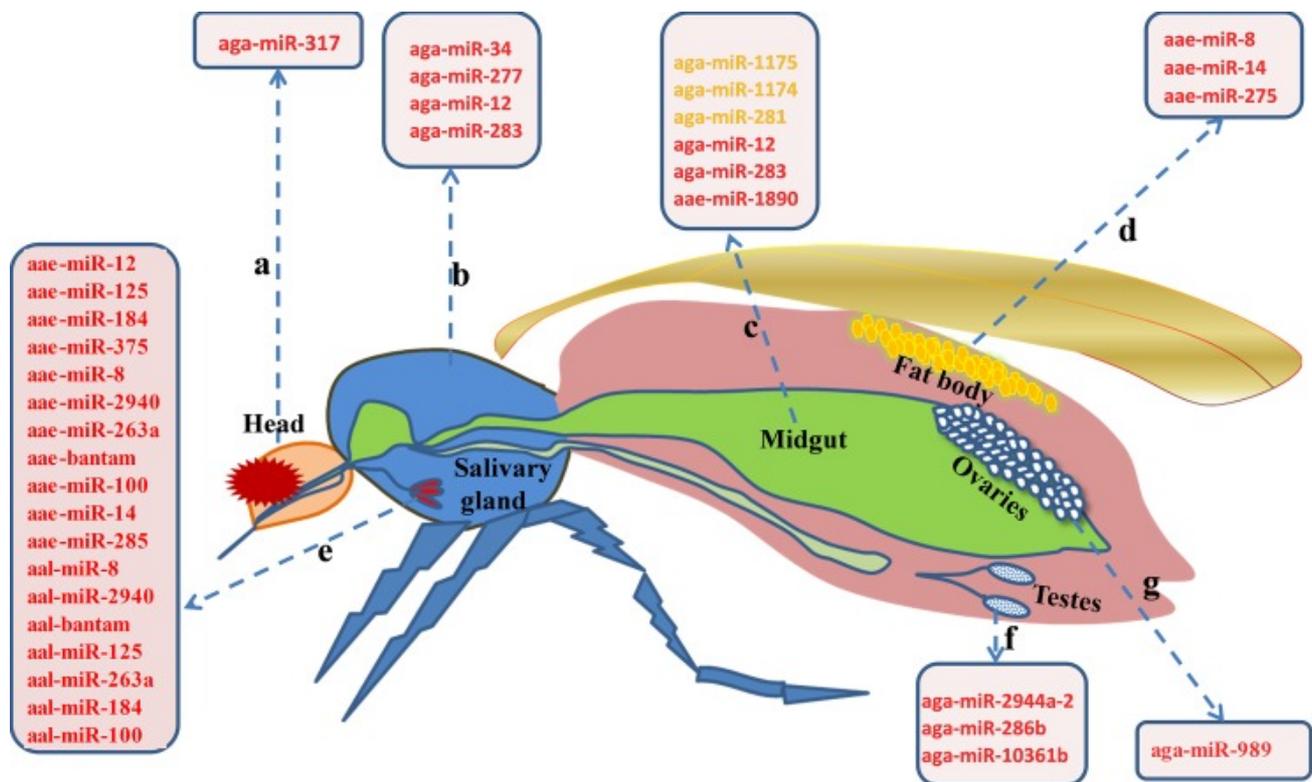


Figure 33. Expression des miRNA dans les différentes parties du corps d'un moustique.

(a) miRNA exprimés dans la tête. (b) miRNA exprimés dans le thorax. (c) miRNA exprimés dans l'intestin. (d) miRNA exprimés dans les corps gras. (e) miRNA exprimés dans les glandes salivaires. (f) miRNA exprimés dans les testicules. (g) miRNA exprimés dans les ovaires. Les miRNA en rouge correspondent aux miRNA très exprimés. Les miRNA en jaune correspondent aux miRNA spécifiques de la zone du moustique considérée. (Feng et al. 2018)

2.8.2. Les cascades de signalisations antivirales

Trois cascades de signalisations peuvent intervenir dans la réponse immunitaire du moustique. Il s'agit de la voie du récepteur Toll, la voie Imd (« immune deficiency ») ou encore la voie Jak/STAT. Ces trois voies ont pour finalité la translocation nucléaire d'un facteur de transcription permettant l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la réponse anti-microbienne (Fig.34).

2.8.2.1. La voie du récepteur Toll

La voie d'activation du récepteur Toll (correspondant à la voie des TLRs chez les mammifères) est initiée après détection de l'agent pathogène (PAMPS), par l'activation de la protéine endogène Spätzle 5 qui se lie alors sur son récepteur Toll. Cette interaction induit la dissociation des protéines Dif et Cactus. Dif peut alors être transloquée dans le noyau cellulaire et agir comme un facteur de transcription permettant l'induction de la transcription de gènes anti-microbiens.

2.8.2.2. La voie Imd

La voie Imd débute par la fixation des motifs PAMPs sur un récepteur PGRP-LC. Les protéines PGRP-LC sont des protéines qui peuvent reconnaître les différentes structures de peptidoglycane. La fixation du motif PAMP sur la protéine PGRP-LC conduit à l'activation et la translocation nucléaire de la protéine Relish, qui agit également comme facteur de transcription pour l'induction de gènes antimicrobiens.

2.8.2.3. La voie Jak/STAT

La voie **Jak/STAT** (correspondant à la voie médiée par l'IFN de type I chez les mammifères) est activée lorsque des protéines (comme Vago) se fixent sur le récepteur transmembranaire semblable à Domeless qui va alors se dimériser (ref : Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*). Cela induit la phosphorylation de la protéine Jak Hopscotch. Il s'ensuit un recrutement et une phosphorylation de la protéine STAT92E. STAT phosphorylée se dimérise et est transloquée au niveau nucléaire afin d'induire la transcription de gènes antimicrobiens. Le mécanisme exact par lequel Dicer-2 induit l'expression de Vago n'est pas encore élucidé.

2.8.3. Les processus d'autophagie et d'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire connu chez les organismes multicellulaires (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Chez les vertébrés l'apoptose peut être déclenchée par deux voies : une voie intrinsèque mitochondriale et une voie extrinsèque faisant intervenir un récepteur de mort cellulaire. Chez les insectes, seule la voie mitochondriale est documentée (Courtiade et al. 2011). Elle se déroule de façon quasi similaire à l'apoptose intrinsèque chez les mammifères. Un signal interne entraîne l'association des protéines DARK et la caspase initiateur DRONC qui correspondent aux protéines APAF-1 et Caspase-9 respectivement chez le mammifère. Ce complexe s'apparente à l'apoptosome et va activer la protéine CxICE correspondant à la caspase 3 chez le mammifère. La protéine CxIAP1 correspond à l'inhibiteur de caspases IAPs chez le mammifère. Les protéines Reaper/Grim/Hid jouent le rôle d'inducteur de l'apoptose telles que Smac/Diablo chez les mammifères.

L'autophagie fait suite à la fixation des motifs PAMPs sur les récepteurs PRR et inhibe la voie de rétrocontrôle négatif opérée par la protéine TOR sur le phagophore qui est le précurseur de la formation du phagosome. Cela conduit à la formation d'un autophagosome mature qui va fusionner avec un lysosome afin de permettre la dégradation du contenu de l'autophagosome (virus).

L'interférence par ARN (ARNi) est la voie la plus utilisée chez le moustique afin de combattre l'infection au VWN. Cette voie regroupe la voie des siRNA, la voie des piRNA et la voie des miRNA.

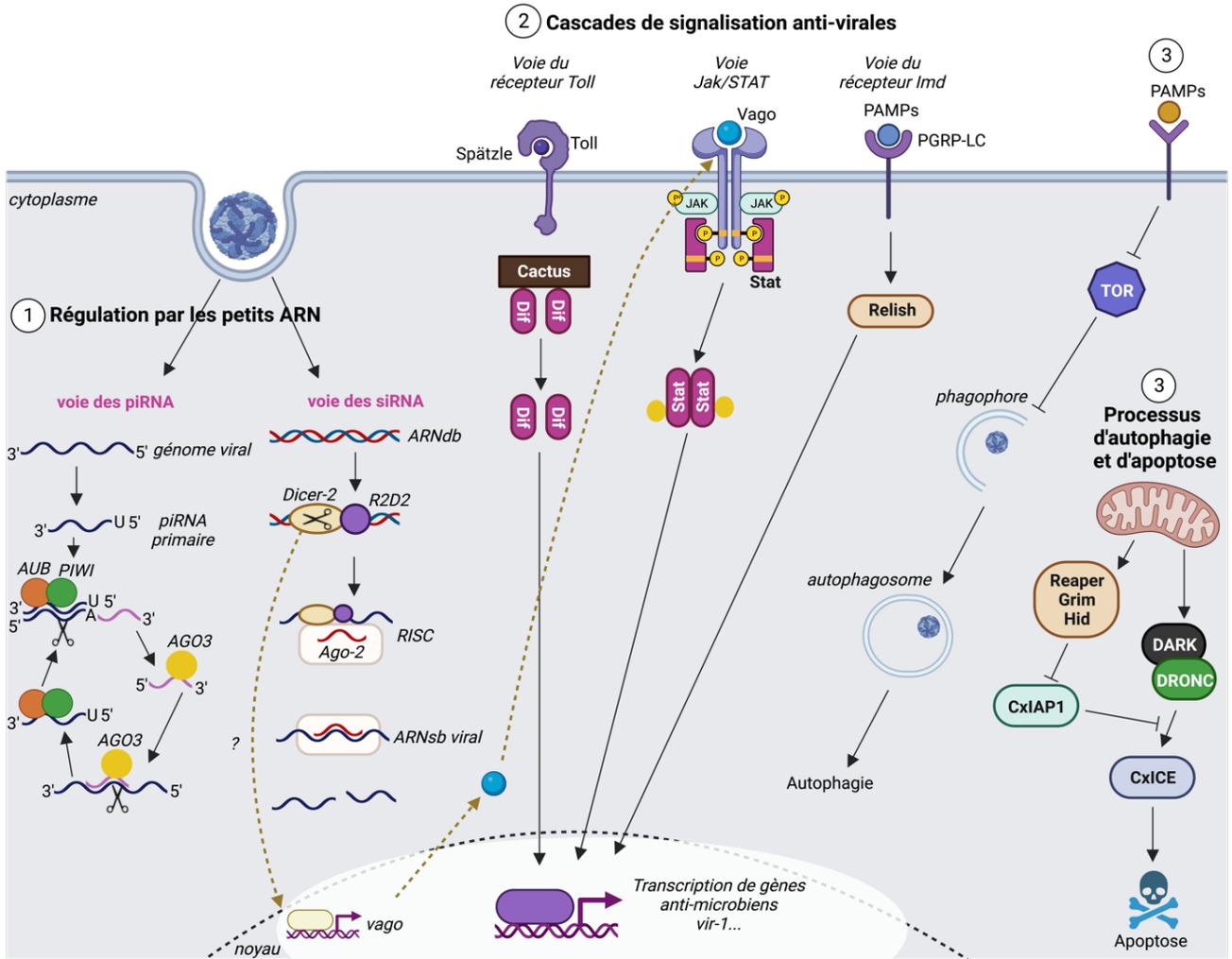


Figure 34. Représentation des différents mécanismes permettant la réponse immunitaire chez le moustique.

La réponse immunitaire chez le moustique se fait selon trois mécanismes majeurs qui sont (1) la régulation par les petits ARN, comme les piRNA ou siRNA ; (2) les cascades de signalisation anti-virales, comme la voie du récepteur Toll, la voie Jak/STAT, ou la voie du récepteur Imd ; (3) les processus d'autophagie et d'apoptose. L'ensemble des mécanismes sont détaillés dans le texte. Réalisation : Fiacre Lise d'après (Prasad, Brackney, and Ebel 2013), réalisé via BioRender.

3. Partie 3 : Étude des déterminants moléculaires de virulence et développement de thérapies vaccinales

3.1. Vaccins existants chez le cheval

Il existe 3 grands types de vaccins utilisés à ce jour pour protéger les chevaux contre West Nile (Tableau 3).

- La première approche consiste à injecter une souche virale inactivée (Samina et al. 2005). C'est le cas du vaccin WN-Innovator® (Fort Dodge Animal Health, KS, USA) inactivé par du formol (Ng et al. 2003). Ce vaccin a obtenu une licence et a été établi comme non dangereux et efficace chez le cheval. Il a également été testé chez le babouin, montrant une augmentation d'IgM et d'IgG spécifiques du VWN (Wolf et al. 2006).

- La deuxième approche consiste à stimuler la réponse cellulaire et la production d'anticorps anti West Nile en utilisant des vecteurs viraux, qui peuvent être des virus de la même famille : virus de la DENV-4 (WNV-DEN4), le virus de la fièvre jaune (Chimerivax™, vaccin chimérique vivant atténué, comportant le génome de la fièvre jaune avec les gènes *prM* et *E* du VWN à la place des gènes équivalents pour la fièvre jaune), ou d'autres virus vecteurs comme le virus canarypox (Recombitek™, equine rWNV; Merial, GA, USA), qui intègre dans son génome les gènes *E* et *prM* du VWN (Arroyo et al. 2004) (Minke et al. 2004) (Pletnev et al. 2003).

- La troisième approche repose sur un vaccin à ADN plasmidique (West Nile-Innovator® DNA (Fort Dodge Animal Health)), basé sur l'utilisation d'un plasmide recombinant (pCBWN) contenant la séquence codant les protéines *prM* et *E*. Une injection intramusculaire unique du plasmide recombinant entraîne alors une réponse immunitaire et conduit à la protection contre le VWN chez les chevaux et chez les souris (Davis et al. 2001). Ce type de vaccin était néanmoins très coûteux à produire et a donc cessé d'être commercialisé.

Type	Antigène	Sponsor	Stage of Development
Chimeric (vector)			
Recombitek™ (canarypox)	WNV-prM-E	Merial	Licensed for horses
Chimerivax™ (yellow fever virus)	WNV-prM-E	Acambis	Phase II
WNV-DENV4 (dengue virus 4)	WNV-prM-E	NIAID/NIH	Phase II
DNA			
WNV-DIII	WNV-DIII	Multiple labs	Preclinical
WNV-E	WNV-E	Multiple labs	Preclinical
WNV-prM-E	WNV-prM-E	Multiple labs	Preclinical
Inactivated/Killed			
Innovator™	Whole virus	Fort Dodge Animal Health	Licensed for horses
Subvirion Particles/Virus-like Particles			
WNV-prM-E	WNV-prM-E	Multiple labs	preclinical

Tableau 3. Liste partielle des principaux vaccins développés sur modèle équin pour le VWN.

(Rossi, Ross, and Evans 2010)

Bien que plusieurs vaccins aient été développés chez le cheval, actuellement, aucun vaccin n'est disponible pour l'Homme. Cette absence est liée au faible intérêt économique. Le ratio coût des recherches/production par rapport au gain effectif après commercialisation penche encore dans le sens d'une absence de développement de vaccin chez l'Homme (Monath 2001). Néanmoins, certaines pistes sont explorées comme (1) un variant du vaccin fièvre jaune-chimérique WNV prM-E /YFV 17D (ChimeriVax™-WN02; Sanofi-Aventis) ; (2) un vaccin chimérique Dengue vivant atténué WNV prM-E/DENV (WN/DEN4-3'delta30; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, MD, USA) (Pletnev et al. 2006) ; (3) un vaccin à ADN CDC WNV prM-E DNA (Vical Inc., PA, USA, et le NIAID) (Martin et al. 2007) et enfin (4) un vaccin utilisant une protéine E tronquée (HBV-002; Hawaii Biotech, HI, USA) (Lieberman et al. 2007) (Lieberman et al. 2009).

Enfin, des études ont également montré que la vaccination contre d'autres flavivirus ou encore l'exposition à d'autres flavivirus, pourrait avoir un effet de protection croisée contre le VWN. Une première étude a permis d'établir la présence d'une protection croisée entre le virus de l'encéphalite japonaise et le VWN. Elle a été menée chez la carouge à épauvette (*Agelaius phoeniceus*) et a montré qu'après une inoculation du virus de l'encéphalite japonaise chez cette espèce d'oiseau, la virémie chez les oiseaux possédant une immunité préexistante contre le VWN est plus faible que chez les oiseaux naïfs (6,3% contre 100% d'oiseaux virémiques respectivement) (N. M. Nemeth, Bosco-Lauth, and Bowen 2009). Une étude similaire a été réalisée chez le

pinson mandarin (*Fringilla coelebs*), hôte du VWN ou du virus de l'encéphalite de Saint Louis. Les oiseaux ont été infectés par les deux virus, puis 6 semaines plus tard par l'un ou l'autre des virus. Les résultats ont montré qu'une première infection avec le VWN entraînait un effet immunitaire contre les deux virus lors de la seconde infection, alors qu'une première infection par le virus de l'encéphalite de Saint Louis permet essentiellement de diminuer la virémie lors d'une seconde infection par le même virus (Fang and Reisen 2006).

Ces données ont permis de montrer qu'une protection croisée entre différents flavivirus est possible mais que toutefois, si l'infection par un premier flavivirus permet la protection contre un autre flavivirus, la réciproque n'est pas nécessairement valable.

3.2. Rôle des déterminants moléculaire dans le développement de thérapies vaccinales

Comme vu ci-dessus, plusieurs approches peuvent être utilisées dans le développement de thérapies vaccinales, dont la génération de souches virales atténuées. En 1930, un vaccin contre la souche française de la fièvre jaune (YFV FVV) est développé après plusieurs passages de la souche sur des cerveaux de souris. La souche obtenue présentait alors 35 mutations par rapport à la souche initialement utilisée (Wang et al. 1995). Toutefois, en raison de son manque d'efficacité, ce vaccin a été stoppé dès 1982. Aujourd'hui, le vaccin contre la fièvre jaune est un virus vivant dont l'atténuation a nécessité plus de 200 passages. De la même manière, un vaccin atténué (SA14-14-2) a été généré pour le virus JEV en réalisant plusieurs passages de la souche JEV SA14 sur des cellules de rein de hamster (Yu 2013). L'analyse des mutations de cette souche atténuée a montré 25 mutations par rapport à la souche *wild type*, notamment les mutations L107F, E138K, I176V, T177A, E244G, Q264H, K279M, A315V, S366A, et K439R dans la protéine E qui seraient suffisantes pour atténuer la neuroinvasion chez la souris. La mutation inverse G244E semble suffisante pour générer une neurovirulence létale chez la souris par son action sur les premières étapes de l'infection (liaison au récepteur, endocytose, fusion de la membrane) (Yun et al. 2014). Le vaccin SA14-14-2 présente également la mutation G66A sur la protéine NS2A, qui joue un rôle dans la suppression de l'expression de la protéine NS1', et donc sur la virulence (Ye et al. 2012). De plus, certaines mutations identifiées pour un virus peuvent être transposées chez un virus de la même famille dans le cadre d'un développement vaccinal. C'est notamment le cas du vaccin ChimeriVax-WN02, comportant les protéines WN prM et E, ainsi que les mutations L107F, A316V, et K440R dans la protéine E identifiées comme importantes dans le vaccin SA14-14-2, afin de diminuer la neurovirulence (Arroyo et al. 2004). L'ensemble de ces études montrent un besoin essentiel de la connaissance des nucléotides impliqués dans la virulence chez l'hôte. Toutefois, il ne faut pas oublier que les virus à transmission vectorielle impliquent également la réplication chez un vecteur comme le moustique pour le VWN. Aussi, au-delà de l'étude des nucléotides d'intérêts dans la virulence chez l'hôte il est essentiel d'investiguer les nucléotides responsables d'une modification de la compétence vectorielle, notamment ceux qui pourraient influencer le passage et la réplication du virus dans les glandes salivaires.

3.3. Introduction à l'étude des déterminants moléculaires de virulence et de pathogénèse chez les hôtes vertébrés et invertébrés

Le VWN est un *flavivirus* responsable d'encéphalites, chez les oiseaux qui sont les hôtes principaux mais aussi chez l'Homme ou chez les chevaux. Plusieurs épizooties de différentes envergures ont eu lieu depuis sa première identification en 1934 en Ouganda. En 1999, une épizootie éclate à New York avec d'importantes mortalités observées notamment chez l'Homme à la suite d'encéphalites mais également chez les oiseaux comme la Corneille d'Amérique, la Corneille de rivage ou encore chez des oiseaux captifs du Zoo (Briese et al. 1999). Plusieurs études ont ensuite permis d'attribuer ces différents cas d'encéphalites à la circulation du VWN. Il s'agit de la plus grosse épizootie jamais observée, due à la circulation du VWN. Toutefois, d'autres épizooties et épidémies ont vu le jour, notamment en Europe où le virus est de plus en plus présent depuis les quinze dernières années, notamment par la dissémination de virus de lignée 2 (Papa et al. 2011). La lignée 1, où on retrouve notamment la souche d'Israël 1998 ou encore celle de New York 1999, renferme les souches les plus virulentes. La différence d'envergure d'une épidémie ou d'une épizootie peut s'expliquer par différents facteurs, tels que les facteurs écologiques comme l'abondance des espèces, l'écologie des espèces ou encore les facteurs climatiques. Toutefois, cela peut également s'expliquer par les espèces hôtes ou vectrices engagées dans l'épizootie, ou encore par les différences génomiques virales. C'est sur cette dernière hypothèse que nous avons décidé de mener nos travaux afin de mieux comprendre si des motifs dans le génome du VWN peuvent être impliqués dans ces modifications de virulence chez l'hôte (mammifère ou aviaire) ou être impliqués dans des modifications de la compétence vectorielle du moustique pour le VWN. Plusieurs travaux similaires existaient déjà sur ce sujet, au début de cette thèse. Nous avons donc réalisé une revue de littérature "Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts" publiée en 2020 dans *International Journal of Molecular Sciences*, qui regroupe l'ensemble des connaissances qui étaient disponibles sur les éléments génomiques du VWN impliqués dans des modifications de la virulence ou de la compétence vectorielle. Cela a permis de mettre en évidence une forte implication des protéines structurales dans la virulence, notamment chez l'hôte mammifère. Toutefois, peu de données étaient disponibles concernant le rôle des protéines non-structurales ou des régions non codantes. Cela a aussi permis de souligner le manque de connaissances chez les hôtes aviaires ou les moustiques. Ces observations suggèrent un besoin de renforcer les connaissances sur les déterminants moléculaires de virulence notamment présents aux extrémités du génome dans les régions non-codantes, dans les protéines non-structurales, mais également les similitudes/différences observées selon l'hôte ou le vecteur considéré, ce qui a été envisagé au cours de nos travaux.

3.4. REVUE PUBLIEE: Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts



Review

Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts

Lise Fiacre ^{1,2,3}, Nonito Pagès ^{2,3}, Emmanuel Albina ^{2,3}, Jennifer Richardson ¹,
Sylvie Lecollinet ^{1,*}  and Gaëlle Gonzalez ^{1,†}

¹ UMR 1161 Virology, ANSES, INRAE, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL for Equine Diseases, 94704 Maisons-Alfort, France; lise.fiacre.ext@anses.fr (L.F.); jennifer.richardson@vet-alfort.fr (J.R.); gaelle.gonzalez@anses.fr (G.G.)

² CIRAD, UMR ASTRE, F-97170 Petit Bourg, Guadeloupe, France; nonito.pages@cirad.fr (N.P.); emmanuel.albina@cirad.fr (E.A.)

³ ASTRE, University Montpellier, CIRAD, INRAE, F-34398 Montpellier, France

* Correspondence: sylvie.lecollinet@anses.fr; Tel.: +33-1-43967376

† Both authors contributed equally to the manuscript.

Received: 16 October 2020; Accepted: 26 November 2020; Published: 30 November 2020



Abstract: West Nile virus (WNV), like the dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YFV), are major arboviruses belonging to the *Flavivirus* genus. WNV is emerging or endemic in many countries around the world, affecting humans and other vertebrates. Since 1999, it has been considered to be a major public and veterinary health problem, causing diverse pathologies, ranging from a mild febrile state to severe neurological damage and death. WNV is transmitted in a bird–mosquito–bird cycle, and can occasionally infect humans and horses, both highly susceptible to the virus but considered dead-end hosts. Many studies have investigated the molecular determinants of WNV virulence, mainly with the ultimate objective of guiding vaccine development. Several vaccines are used in horses in different parts of the world, but there are no licensed WNV vaccines for humans, suggesting the need for greater understanding of the molecular determinants of virulence and antigenicity in different hosts. Owing to technical and economic considerations, WNV virulence factors have essentially been studied in rodent models, and the results cannot always be transported to mosquito vectors or to avian hosts. In this review, the known molecular determinants of WNV virulence, according to invertebrate (mosquitoes) or vertebrate hosts (mammalian and avian), are presented and discussed. This overview will highlight the differences and similarities found between WNV hosts and models, to provide a foundation for the prediction and anticipation of WNV re-emergence and its risk of global spread.

Keywords: West Nile virus; virulence; molecular determinants; vertebrate and invertebrate hosts

1. Introduction

Since its first isolation in 1937 in the province of Uganda [1], West Nile virus (WNV) has been a leading cause of neuroinvasive diseases in humans [2]. Its spread across the world, and notably its outbreak in New York City in 1999 and subsequent rapid diffusion across the American continent, identified WNV as a major public health problem [3]. Indeed, this event is the most representative example of WNV emergence and pathogenicity. A highly virulent strain of WNV lineage 1a was first isolated in New York City during the summer of 1999. From 1999 to 2016, 7 million infections were reported, leading to 24,000 neuroinvasive cases and 2300 deaths [4]. The virus then spread rapidly across North, Central, and South America [5], causing severe neurological disorders and death in humans and horses and affecting wild bird populations, in particular those belonging to the order Passeriformes, like the American crow (*Corvus brachyrhynchos*), mainly in the USA and Canada [6–8].

WNV is endemic in Africa, Europe, the Middle East, west and central Asia, Oceania (subtype Kunjin), and, most recently, North America, and is spreading into Central and South America [9,10]. WNV is a member of the *Flaviviridae* family. Its genome, a positive single-stranded RNA (+ssRNA) of 11 kb, encodes three structural proteins (C for capsid, (pr)M for (pre)membrane, and E for envelope) and seven non-structural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5), which are generated from a single polypeptide cleaved by several viral and host proteases [11]. The three structural proteins play a role in virion entry and egress [12] while the NS proteins play a role in intracellular multiplication, virion assembly, and escape from host immunity [13].

Based on phylogenetic analysis, WNV is classified into eight lineages [14]. WNV lineages 1 and 2 are the most widely distributed [15]. WNV lineage 1 strains have been reported in many areas, including America, Africa, Europe, India, the Middle-East, Russia, and Australia, and are responsible for major human and equine outbreaks, particularly in Europe and North America [6,16,17]. Several autochthonous cases of encephalitis after WNV lineage 1 infection were reported in Africa, the Middle East, and Europe during the last decades [6,18,19]. WNV lineage 1 can be divided into three sublineages. Lineage 1a includes isolates from Africa, the Middle East, America, and Europe. Lineage 1b includes the Kunjin virus (KUN), which is a subtype of the West Nile virus present in Australasia, a part of Oceania. Finally, lineage 1c corresponds to isolates present in India [20]. WNV lineage 2 viruses were originally isolated from sub-Saharan Africa and Madagascar, causing mainly mild fevers with no impairment of the central nervous system in humans. However, in 2009–2010, neuroinvasive disorders were observed, especially in Greece, Hungary, and South Africa [21,22]. Unprecedented WNV transmission seasons and outbreaks reported in Europe in 2010, 2012, 2013, and 2015 were associated with the introduction and spread of WNV lineage 2 strains [10]. These were first detected in Hungary in 2004 [23] and subsequently spread to the eastern part of Austria in 2008 [24,25], to the south of Italy in 2011 [26], and to the Balkan peninsula, including Greece in 2010 [27] and Serbia, Croatia, and Bulgaria in 2012 [28], and more recently reached Spain in 2017 [29] and Germany in 2018 [30,31]. Another WNV lineage 2 strain, first detected in 2004 in Rostov Oblast in Southern Russia [32], has also been occasionally reported in Europe, such as in Romania in 2010 and in Greece in 2018 [28,33,34]. The majority of neuroinvasive disorders in humans from 2010 onwards were associated with infection by WNV lineage 2 strains. Concomitantly, neuroinvasive diseases were diagnosed in horses and in humans in South Africa. These were also associated with infection by lineage 2 strains of the WNV [35]. Before that, less virulent lineage 2 strains had already circulated in South Africa, but without neuroinvasive cases.

Since its emergence in New York in 1999, intensive work has been performed on the critical viral proteins and host factors implicated in WNV virulence and immunopathogenesis [11,36–38]. WNV infection results in an intricate balance between viral pathogenesis and immune-system mediated control [39,40]. However, the immunopathogenesis of WNV remains poorly understood. Neuronal injury may be directly caused by viral infection as well as through leucocytes infiltration and host inflammatory responses. Innate, humoral, and T-cell mediated host defenses orchestrate the control of WNV infection. Type I interferons are essential for restricting WNV replication and neuroinvasion into the CNS, while humoral immunity is involved in peripheral viral clearance [41,42]. However, the *in vivo* dynamics of innate and adaptive immune responses that are associated with differential outcomes of WNV infection in humans remains largely unknown. WNV shaped several countermeasures to evade host defenses (with NS1, NS2A, NS4B, and NS5 contributing to WNV evasion from the innate immune system). Moreover, WNV proteins like NS3 may also directly contribute to virus-mediated cytotoxicity, for example, by triggering apoptosis of infected cells [43]. However, a differential impact of the WNV strains on tissue pathogenesis is not necessarily linked to their virulence in a given host. In our previous study conducted by Donadieu et al., differential lesions of WNV Is98 and Kunjin strains after intracerebral inoculation of mice bore no relationship to virulence [41]. Indeed, the more virulent strain (WNV Is98) appeared to induce the lowest level of apoptosis. This strongly suggested that neuronal death in different areas of the brain was not directly linked to WNV virulence. Neuronal

dysfunction alone might possibly have determined the clinical outcome of the disease. The observed differences are presumed to be of genetic origin. Mutations in genes implicated in viral adsorption, such as the E gene, or in viral replication have been shown to modify the organ tropism [13] and attraction of inflammatory cells implicated in the immune response [44].

Approximately 80% of human WNV infections are asymptomatic. In most symptomatic cases (20%), patients display mild febrile illness, associated with myalgia, arthralgia, headache, fatigue, intestinal complications, maculopapular rash, or lymphadenopathy. Less than 1% of these develop severe neurologic complications, manifested by different pathologies such as acute flaccid paralysis, meningitis, encephalitis, or eye disorders [45]. Encephalitis is the most severe neurological form, which occasionally can be fatal, particularly in the elderly and immunocompromised persons [11,46].

WNV is an arbovirus that is amplified in a bird–mosquito–bird enzootic transmission cycle, with wild birds as the primary hosts [47]. Humans and other mammals are considered to be accidental or dead-end hosts (Figure 1).

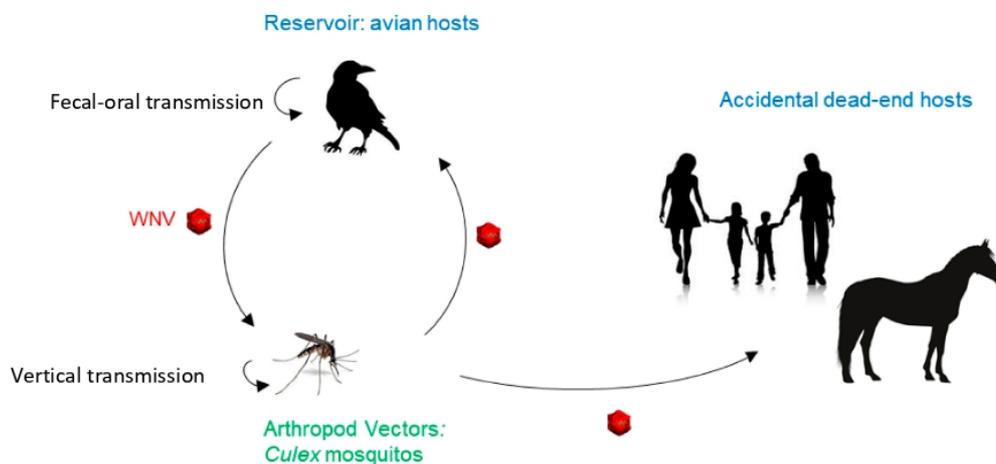


Figure 1. West Nile virus (WNV) transmission cycle. In nature, WNV transmission occurs through an enzootic cycle between birds and mosquitoes, the latter mainly of the genus *Culex*. Humans and mammals can be infected but are considered to be dead-end hosts.

WNV has been detected in 65 different mosquito species and more than 326 species of birds. Transmission to mammals and especially to humans is mainly carried out by *Culex* spp. (*Cx* spp.) mosquitoes. In birds, WNV produces an acute infection typically lasting up to a week. The viremia is typically short (a few days); however, the level of viremia can substantially differ among species (high in some bird species while lower in mammalians). Nevertheless, the virus has been shown to persist for several weeks in some wild birds. Avian species vary in susceptibility to infection and severity of the disease (from asymptomatic to severe neurological signs and sudden death), with mortality ranging from 0% to 100%. Symptoms vary from weight loss, lethargy, loss of vision, to neurological signs, including loss of coordination, tilting of the head, tremors, weakness, and lethargy [48,49]. In birds, WNV invades the CNS and other organs such as the heart, liver, spleen, and kidney. Passerines are the most affected, with the highest viremia and mortality rates, whereas gallinaceous birds exhibit no mortality and morbidity and a very low viremia.

Depending on the geographic location, vector species vary. Of note, for a given vector species, behavior and susceptibility to arbovirus infection can vary between geographically separated populations. In Africa and the Middle East, the main vector is *Cx. univittatus*, but other species—such as *Cx. poicilipes*, *Cx. neavei*, *Cx. perexiguus*, *Cx. decens*, *Aedes albocephalus*, or *Mimomyia* spp.—are also present. In Europe, the main vectors seem to be *Cx. pipiens*, *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, and *Coquillettidia richiardii* [50]. *Aedes albopictus* is known to be a vector of other flaviviruses, including

Dengue virus (DENV) [51]. A recent study performed by Akiner and colleagues (2019) in Turkey, found WNV by PCR in *Ae. albopictus* collected in the field [52]. However, WNV has not as yet been isolated from *Ae. albopictus* in Europe [53]. The vector competence of *Ae. albopictus* for WNV has been demonstrated in laboratory experiments [54], while *Ae. aegypti*, another mosquito species implicated in flavivirus transmission, is not competent for WNV [55]. In Asia, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, and *Cx. vishnui* predominate [47,56,57]. Finally, in the United States, it appears that the species involved in WNV transmission are *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, and *Cx. tarsalis* [48]. In Australia, *Cx. annulirostris* is considered the most important vector of WNV KUN [58]. WNV KUN has been isolated from other Australian species, including *Ae. tremulus*, *Cx. australicus*, *Cx. squamosus*, *Ae. alternans*, *Ae. normanensis*, *Ae. vigilax*, *Anopheles amictus*, and *Cx. quinquefasciatus*, but the role of most of these species is likely to be secondary [59].

WNV needs to cross many barriers in vertebrate and invertebrate hosts during its transmission cycle. After being ingested with infected blood, the WNV must first infect the midgut of the mosquito. The virus then crosses the midgut barrier and diffuses in the hemolymph to other organs, including the salivary glands, whose infection is a prerequisite for WNV transmission to new susceptible vertebrate hosts (Figure 2). In vertebrates, WNV first replicates in the keratinocytes in the epidermis. Thanks to the expression of numerous Pathogen Recognition Receptors (PRRs), keratinocytes are involved in the sensing of Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). WNV infection leads to inflammatory responses in the keratinocytes that are characterized by the induction of type I or type III IFNs or the secretion of cytokines like TNF α (tumor necrosis factor) or IL-6 [60]. At later stages, WNV is internalized by skin dendritic cells (DCs) or Langerhans cells. Then, infected DCs migrate to the lymph nodes, and WNV disseminates to other lymphoid organs, such as the spleen. Most virulent WNV strains are inherently neuroinvasive and neurovirulent. To reach the brain, the virus needs to cross the blood–brain barrier (BBB), which can occur by two main routes. The first involves axonal retrograde transport along the spinal cord, and the second blood vessel transport. In the second case, the virus can use three methods to enter the brain: (I) the “Trojan horse”, in which the virus is internalized into lymphocytes that are able to cross the BBB; (II) permeabilization of the BBB by matrix metalloproteinases (MMPs) after MIF (macrophage migration inhibitory factor) and TNF- α secretion by leukocytes [61–64]; and (III) transcellular passage through the BBB, probably influenced by protein E glycosylation [11,65]. CNS entry of the WNV is a multistep process involving different mechanisms, whose importance would need to be better characterized. Infection of brain microvascular endothelial cells (BMECs) are thought to occur first. BMEC infection leads to increased expression of adhesion proteins and production of chemokines, responsible for leukocyte recruitments at the BBB. MMP9 can also play a role in the infiltration of WNV-infected leukocytes through the BBB [66]. Both mechanisms can contribute to WNV crossing the BBB by the “Trojan horse” mechanism [67] (Figure 3).

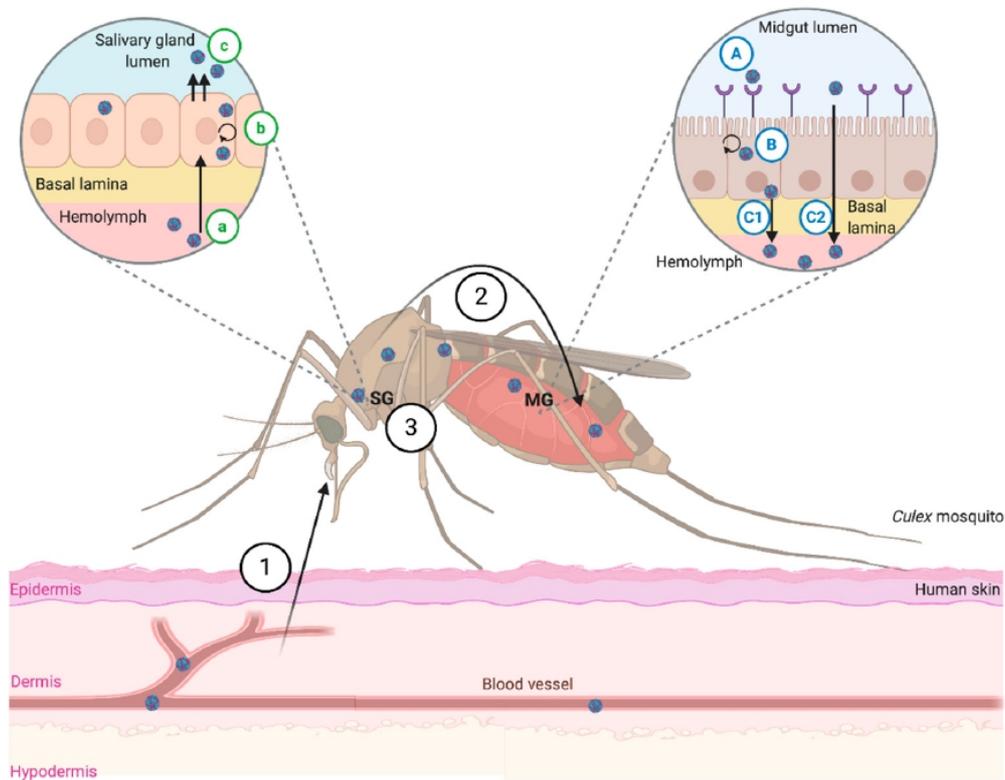


Figure 2. Dissemination steps of WNV in the invertebrate vector. (1) Mosquito feeds on virus-infected blood. (2) WNV infects mosquito midgut: (A)—Virus binds to epithelial cells by a protein receptor. (B)—Viral replication in midgut cells. (C1)—Direct passage from basal lamina to hemolymph (1st way). (C2)—Direct paracellular passage through midgut cells (2nd way). (3) Dissemination of WNV to other organs like salivary glands: (a)—Infection of epithelial cells by direct passage from hemolymph to cells. (b)—Viral replication in epithelial cells. (c)—Release of virus from cells to salivary gland lumen, with or without apoptosis of epithelial cells (inspired by [68,69]).

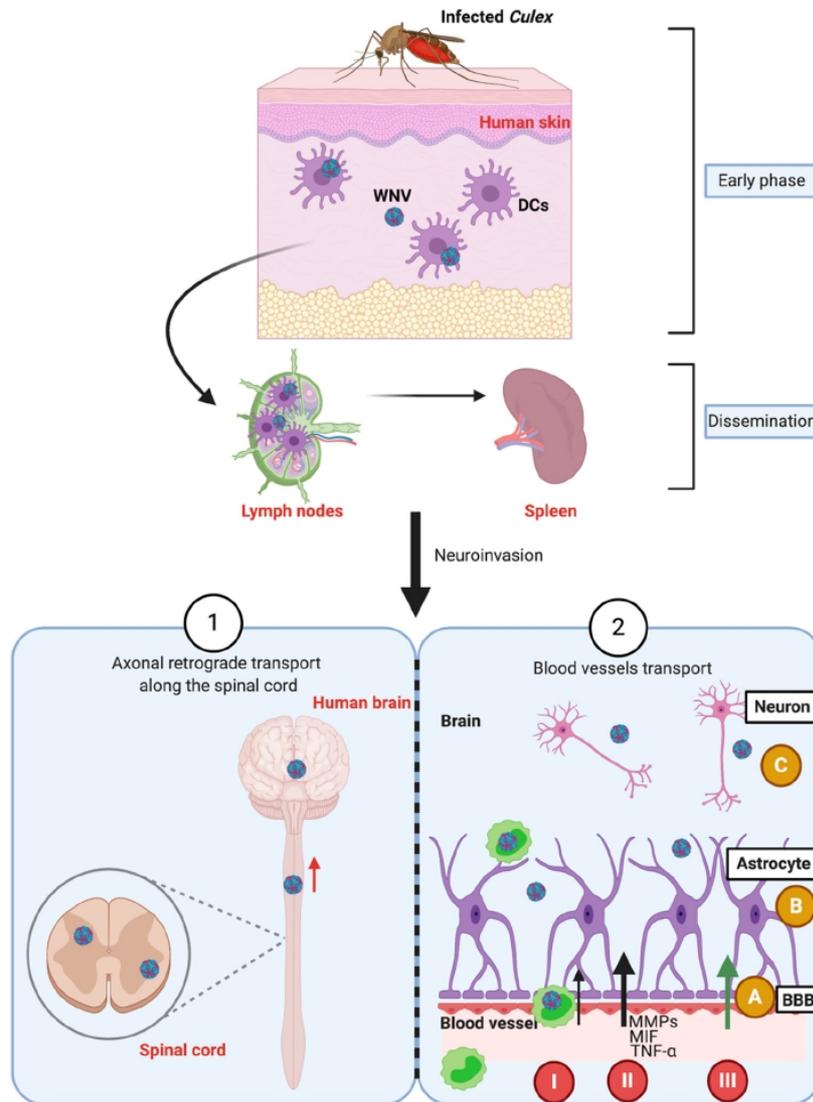


Figure 3. Dissemination steps of WNV in vertebrate hosts such as humans. At the early phase of infection, WNV disseminates in the human skin after a WNV-infected mosquito bite. First, replication begins in the keratinocytes and dendritic cells (DCs) and is followed by a migration of the WNV into the dermis. After that, DCs containing the WNV migrate to the lymph nodes where the WNV is amplified. Systemic viremia gives rise to infection of peripheral organ infection, such as the spleen. More severe infections lead to neuroinvasion by two possible routes. The first (1) consists of an axonal retrograde transport along the spinal cord [70]. The second (2) involves blood vessel transport and crossing over the blood–brain barrier (BBB). Three steps are required to mediate the neurovirulence in the brain by the blood route: (A)—Crossing the BBB. (B)—The virus interacts with the brain cells. (C)—Infection of neurons. To cross the BBB, three methods are possible. (I)—The first is a “Trojan horse” mechanism, in which the WNV is internalized into lymphocytes that are able to cross the BBB. (II)—The second method is permeabilization of the BBB in response to TNF- α and MIF secretion. After MIF secretion by leucocytes, the MMPs are produced and increase the BBB permeability [51–54]. (III)—The third is enhancement of virus attachment, probably dependent on E protein glycosylation, which permits transcellular passage (inspired by [11,65]).

Some genetic changes are favorable to WNV transmissibility, thereby facilitating expansion of the WNV [71,72]. It is well documented that natural WNV infections are derived from a genetically diverse population of viral genomes. Within an individual host, WNV exists as a genetically heterogeneous mixture of variants that differ from a consensus nucleotide sequence; this population structure is referred to as a viral quasispecies [72,73]. WNV populations within field mosquitoes are more genetically diverse than those found in naturally infected birds. This results from several bottlenecks that shape the virus divergence during the progress of infection in birds, including the host defenses, varying cellular environments in different tissues, and anatomic barriers, such as the BBB. These multiple selective pressures determine tissue tropism and virus pathogenesis. Moreover, Jerzak and colleagues serially passaged a genetically homogenous population of WNVs in either mosquitoes or birds, and observed greater intra-host genetic diversity in mosquitoes than does chickens [74] (Figure 4). It is noteworthy, however, that most avian studies have involved fowl in which the replication of WNV is poor.

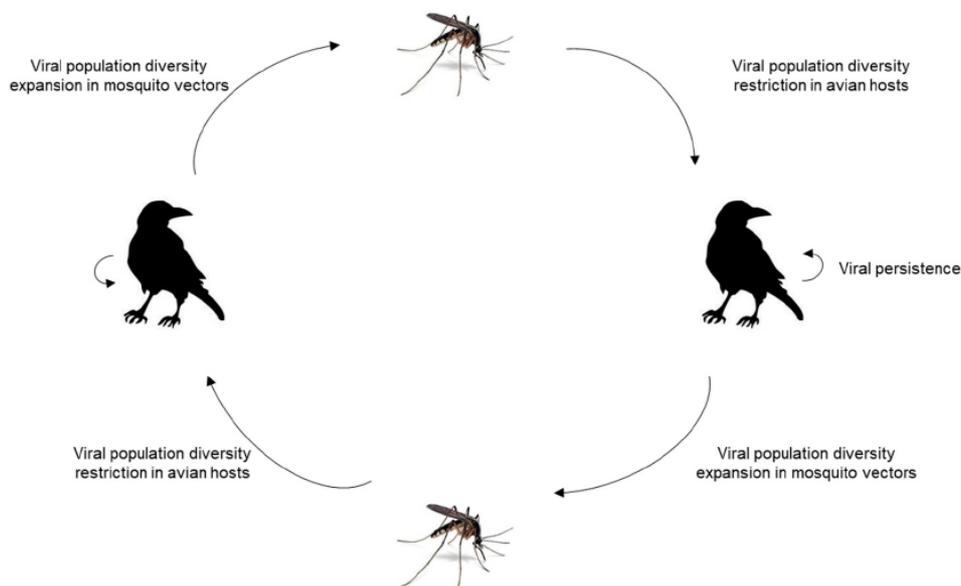


Figure 4. WNV evolution through genetic diversity balance between the avian hosts and mosquito vectors. Viral diversity increases in mosquitoes and decreases in birds.

This predisposition for high genetic variability explains why, despite the small size of the viral genome (about 11 kb), wide genetic variation within the WNV lineages is observed across the world. The relationship between genetic heterogeneity and viral pathogenicity is variable. Indeed, viral heterogeneity was associated with enhanced pathogenicity for the mumps (ourlien) virus and poliovirus, but with weaker pathogenicity for the hepatitis C virus. Of note, WNV virulence in mice was negatively correlated with WNV genetic diversity [75]. WNV studies have shown that molecular determinants of virulence identified in mammals were not systematically shared by avian hosts or mosquito vectors, highlighting the importance of studying the molecular determinants of virulence across a broad host range [76].

Understanding the impact of WNV genetic variations on virulence is key for evaluation and anticipation of pathogenicity, for development of prophylactics, and for prediction and timely response to new epizootics. Identification of critical genetic determinants may be carried out through reverse genetic approaches, site-directed mutagenesis, and sequencing. It has been known for years that the genome of positive-strand RNA viruses, like flaviviruses, can be infectious when introduced into susceptible cells by transfection [77]. On this basis, reverse genetic technology permits manipulation of viral genomes and analysis of consequent changes in viral pathogenesis, as well as virulence, cell

entry, or viral replication. Development of new molecular tools like PCR or RT-PCR at the end of the 1980s [78] greatly facilitated reverse genetic approaches. However, the absence of commercial reverse genetics kits led scientists to develop their own protocols [79]. The earliest procedures required bacterial or yeast cultures. In the former case, an isolated viral RNA extract is first reverse transcribed into cDNA and then typically inserted into a plasmid vector containing a promoter recognized by a DNA-dependent RNA polymerase (e.g., T7 or SP6) and the HDR/SV40pA sequences. Bacterial cultures are then transformed with the vector containing the viral sequence for amplification. Bacteria are collected and the vector containing the viral sequence, called the infectious clone (IC), is purified. Depending on the promoter choice, further steps may be needed before transfection of permissive cells with the IC to generate infectious viruses. However, toxicity of the full-length flavivirus genome for bacterial hosts has often been noticed. Moreover, this technology is particularly laborious. For this reason, new bacteria-free reverse genetic approaches for RNA viruses, and for flaviviruses in particular, have been developed since 1995, such as long PCR [80], circular polymerase extension cloning (CPEC), Gibson assembly [81,82], or the infectious subgenomic amplicons (ISA) [83] method. The ISA method's main advantage is its rapidity. However, despite the use of a high-fidelity polymerase for PCR reactions, genomic heterogeneity was evidenced in the generated clones. In order to reduce the viral genomic heterogeneity, PCR fragments were cloned into plasmids in the subgenomic plasmid recombination method (SuPREME) (2019) [84] (Figure 5). These new protocols allow rapid generation of infectious clones and will support further investigation of the pathobiology of flaviviruses.

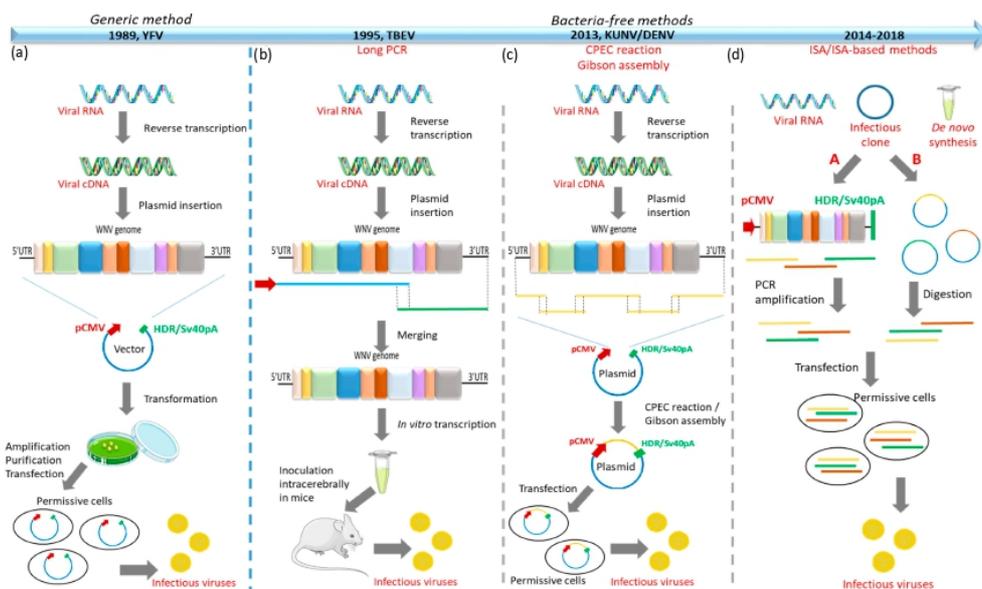


Figure 5. Overview of the main reverse genetic methods. (a) First generic method for reverse genetics developed in 1989 for YFV. cDNA was produced from viral single-stranded RNA, and then inserted into a plasmid upstream of a pCMV promoter and downstream of the hepatitis delta ribozyme, followed by the simian virus 40 polyadenylation signal (HDR/SV40(pA)) sequence. After amplification and purification, the construction was introduced into permissive cells by transfection, and infectious clones were obtained. (b) Bacteria-free method used for TBEV in 1995. Two long PCR products were synthesized and joined by using restriction enzymes or fusion PCR. After *in vitro* transcription, infectious clones were generated after intracerebral inoculation of mice with the long PCR fragment. (c) Bacteria-free method using the CPEC (KUN) or Gibson reaction (DENV), 2013. Multiple PCR amplicons were inserted into a plasmid containing pCMV and HDR/Sv40(pA) sequences and joined by CPEC or Gibson reaction. Infectious clones were obtained after transfection of permissive cells. (d) New bacteria-free method for

reverse genetics in flaviviruses. (A)—In the infectious subgenomic amplicons (ISA) method the genetic material consists of viral RNA, infectious clones, or de novo synthesis. PCR products that cover the entire genome are used for direct transfection of permissive cells. (B)—The new ISA-based reverse genetic method, called the subgenomic plasmids recombination method (SuPREMe), resembles the ISA method, but the genome fragments are cloned into plasmids at the restriction sites. After restriction enzyme digestion, genomic fragments are used for transfection of permissive cells, and infectious clones are produced (according to [79]).

This review will present an overview of the known molecular determinants involved in WNV virulence and pathogenicity according to the host. The aim is to highlight the determinants that are specific to a given host, as well as those that the host have in common, in order to provide a better understanding of WNV virulence and to provide a foundation on which measures to control WNV spread and outbreaks can be proposed.

2. Mammalian Model

WNV infection has been extensively studied in mouse models. These studies have provided an understanding of viral pathology in humans and other susceptible mammalian hosts, and have shed light on the molecular pathways implicated in the innate control of infection in mammals and on molecular determinants of virulence. Researchers have mainly used C57BL/6 and C3H mouse models to decipher WNV infection and immunity [85,86]. In these inbred mice, inter-individual variation in the outcome of WNV infection is limited, thus facilitating interpretation and the inference of statistical significance. Outbred mice (NIH Swiss, CD-1 mouse model) have also been used, since they are more robust and provide a somewhat more physiological model, owing to their genetic heterogeneity. To enrich WNV studies and capture more phenotypic characteristics of West Nile disease, other strains of mice may be used, such as the Collaborative Cross (CC) strains. These include five inbred strains (C57BL/6J, A/J, 129S1/SvImJ, NOD/ShiLtJ, and NZO/H1LuJ) and three wild-type-derived strains (CAST/EiJ, PWK/PhJ, and WSB/EiJ) [87]. In conclusion, the mouse background strain should be carefully selected according to the objectives of the study in question. Of note, all regions of the WNV genome have been studied in mouse models. With the exception of the C and NS2B sequence regions, molecular determinants for mammals have been identified in all parts of the WNV genome (Figure 6). These findings are detailed and discussed in the next sections.

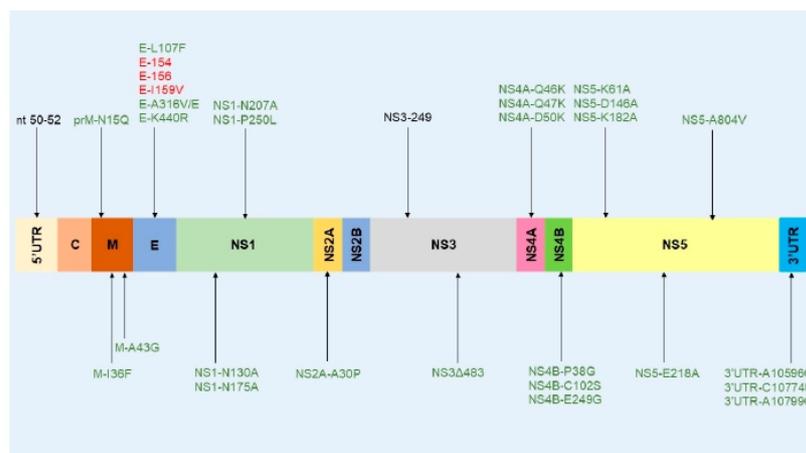


Figure 6. Virulence determinants in the WNV genome found in mammalian hosts. Molecular virulence determinants found in vitro or in vivo in mammalian cells (Vero, A549) and mouse models are represented throughout the entire WNV genome. Green: mutations involved in the attenuated viral phenotype. Red: mutations involved in the more virulent viral phenotype (adapted from [88]).

2.1. The 5'UTR Non-Coding Region

The WNV polyprotein sequence is flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs). The WNV 5'UTR region is 96 nt long and is highly conserved compared to other members of the flavivirus family. It contains two stem-loops (SLA and SLB). This region plays a role in viral cyclization and replication [89,90].

Audsley and colleagues [91] created chimeric viruses between an IC derived from the North American isolate WNV NY99 4132, isolated in 1999 in New York City, and the KUN virus, and more particularly between their 5'UTR and 3'UTR non-coding regions. They placed the non-coding regions of the IC NY99 into the KUN backbone, either the 3'UTR alone, the 5'UTR alone, or both of the non-coding regions of IC NY99. In vitro plaque assays performed on mammalian Vero and A549 cells and on mosquito C6/36 cells yielded similar results for the different mutants. Growth curve analysis identified minor differences between the mutant and the parental KUN strain. The main difference was obtained in vivo, upon intraperitoneal inoculation of mice with 10 PFU of the wild-type (wt) or mutant viruses. According to the results, the KUN virus with the 5'UTR of WNV NY99 (KUN-NY99 5'UTR) was significantly more virulent than the KUN wt. To understand which nucleotides of the NY99 5'UTR region were responsible for the increased virulence, the sequences of the 5'UTR region of KUN and NY99 were aligned. Only three nucleotide differences were found between the two strains. Indeed, while TTG is found at position 50–52 of the KUN virus, AAC is found in WNV NY99. Further alignment of multiple WNV strains showed that most WNVs have the sequence AAC. These nucleotides located in the 5'UTR region could partly explain the difference observed in virulence. However, when both non-coding regions of the KUN virus are replaced by those of NY99, the increased virulence is abolished. Thus, some component of the 3'UTR appeared to counterbalance the effect of the 5'UTR. In addition, replacement of the 5'UTR of NY99 by the KUN analogue failed to mitigate the virulence of NY99. Rather, this interchange resulted in only a marginal impact on virulence, probably because virulence depends upon multiple genetic determinants, as suggested by the +/- interplay between the 3' and 5'UTR regions. However, taken together, these results suggest that the 5'UTR non-coding region of the WNV contributes to WNV virulence in mice.

2.2. Structural Proteins

2.2.1. prM Protein

The glycoprotein precursor of the M protein, prM (26 kDa), is translocated into the ER by the C-terminal hydrophobic domain of the C protein [13]. The N-terminal region of the WNV prM contains one N-linked glycosylation site at amino acids 15–17, which plays a role in virus infectivity and particle release [92], and six conserved cysteine residues [93]. The prM protein promotes the correct folding of the E protein. Its major role is to allow the structural rearrangement of the E protein during transit through the secretory pathway, after prM cleavage by furin, to yield mature M proteins [94,95].

Hanna et al. [92] investigated the impact of prM and E glycosylation on WNV assembly and infectivity. Glycosylation of prM was ablated by a prM-N15Q mutation. The authors performed infection of HEK-293 cells with the wt virus and the prM-N15Q mutant WNV. They demonstrated that the viral RNA content decreased when the cells were infected with the mutant virus, influencing later stages of the virus life cycle in infected cells. We hypothesize that such a mutation would affect virus replication and dissemination in vivo.

Some studies have shown that mutations in the protein M could produce attenuated flaviviruses, such as JEV [96]. A recent study of Basset et al. [97] investigated the effect of protein M mutation in WNV. The authors generated WNV mutants by PCR from an IC of WNV Israel 98 (IS98) [3], which is genetically closely related to the NY99 strain. The first attenuated mutant (M-I36F) proved unstable. Introduction of a second mutation, A43G, created the stable mutant M-I36F/A43G. Smaller plaques were obtained on Vero cells for the M-I36F WNV, suggesting an attenuated phenotype, while normal plaques were seen for the M-I36F/A43G strain. Viral titers of both mutants (M-I36F and M-I36F/A43G),

however, were considerably lower than those of IC IS98 or M-A43G. In vivo experiments performed on BALB/c mice showed that inoculation of wt or M-A43G WNV generated high mortality, whereas all mice infected by the M-I36F/A43G mutant survived. It is known that the M-36 residue is located in the pro-apoptotic domain of the M protein (« apoptoM ») and plays a role in the virulence of other flaviviruses, such as DENV [98,99]. The results obtained for WNV support this observation and show that M-36 mutants could be useful for vaccine development against WNV and other flaviviruses.

2.2.2. E Protein

E protein is composed of 500 amino acid (aa) residues. Its final molecular weight depends on the glycosylation state of the protein, and ranges from 53 to 60 kDa. Its main role lies in the recognition of mammalian cell receptors as well as membrane fusion with the membrane of endocytic vesicles. It constitutes three domains, DI to DIII [100]. DI forms an eight-stranded β -barrel; DII is a long finger-like domain that contains at its tip the putative fusion peptide, which triggers fusion with the target cell membrane; and DIII assumes an immunoglobulin-like domain and is involved in receptor binding [101]. Several studies report the importance of protein E in WNV virulence, and in particular, its N-glycosylation site located at residues 154 to 156 [102,103].

Genetic comparison of all flaviviruses shows that there is a great diversity in the sequence of the gene encoding protein E. In 1995, a study focused on the amino acids NYS (positions 154–156) and their role in the glycosylation and antigenicity of protein E of the Kunjin virus, WNV lineage 1b [104]. In 1997, construction of a phylogenetic tree of WNV strains based on the sequence encoding the E protein evidenced differences in amino acids 154 to 157 for many strains of WNV [105]. Many subsequent studies have built upon these findings.

Beasley and colleagues investigated the difference in the E protein of the highly virulent WNV lineage 1 NY99 strain and the less virulent Old World ETH76a strain, the objective being to understand why the WNV NY99 strain was more virulent. Sequence alignment revealed that the differences included five amino acids of the E protein, which might affect protein glycosylation. Site-directed mutagenesis and construction of chimeric viruses showed that the Asp residue at position 154 in NY99 results in a glycosylated E protein, whereas a Ser154 residue in ETH76a leads to a non-glycosylated E protein [102,103]. This may partly explain why virulence differs between these two strains.

Many studies concerning residues 154 to 156 have further confirmed the role of the glycosylated E protein of the WNV [102,106–108] in neurovirulence and neuroinvasion. Alsaleh et al. investigated the determinants of virulence for European-Mediterranean WNV strains. Chimeras were generated between the highly virulent IS98 strain and the non-pathogenic Malaysian Kunjin virus (KJMP-502) and evaluated in BALB/c mice. In contrast to WNV strain IS98, the KJMP-502 strain and all of the chimeras thereof possessing the KJMP-502 structural proteins were not neuroinvasive. Because the E protein is involved in receptor binding and cell entry, the authors generated the following chimeric viruses involving swaps of the E protein: IS98/E-KJMP and the reciprocal KJMP/E-IS98. The fatality rate was high (60%) 16 days after inoculation of mice with KJMP/E-IS98, while all mice challenged with IS98 died before the 10th day of infection and all mice challenged with IS98/E-KJMP remained healthy and survived for at least 18 days. This result suggests that even if the E protein plays a major role in the virulence of IS98, other factors may account for the residual difference in virulence between IS98 and KJMP/E-IS98. Other analyses showed that IS98 possesses the N-glycosylation site NYS at positions 154–156, whereas KJMP-502 has a proline residue at position 156, thus abrogating the N-glycosylation site. To understand whether the N-glycosylation site in the E protein is implicated in the neuroinvasiveness of IS98, the same authors employed site-directed mutagenesis to generate the IS98-E-S156P (–glyE) and its reciprocal mutant KJMP-E-P156S (+glyE). In vivo experiments showed that 70% of mice inoculated with IS98-E-S156P survived whereas all mice inoculated with IS98 died. Thirty percent of mice inoculated with KJMP-E-P156S died several days after inoculation whereas all mice inoculated with the parental KJMP-502 survived. These results suggested that although

E-glycosylation is important for WNV pathogenicity, additional motifs in the E protein are probably involved in neuroinvasiveness and neurovirulence.

In the early 2000s, the distribution of WNV expanded to a greater extent in America than ever observed elsewhere, suggesting the possible emergence of a higher virulent phenotype. Davis et al. [109] sequenced the prM and E proteins of 74 isolates and the complete genome of 25 isolates obtained between 2001 and 2004. They found that genetic variants had arisen during the study period and were grouped temporally and geographically, suggesting that a dominant variant had rapidly emerged in North America. They also found that the E-V159A mutation (compared to initially introduced WNV NY99) was conserved in many WNV isolates recovered after 2001, suggesting a link with the enhanced WNV spread and pathology in America after the year 2000 [110].

A recent study by Kobayashi et al. [111] supports this scenario. WNV recombinants between the highly virulent lineage 1 strain NY99 (V159) and the less virulent Eg101 (I159) strain were generated but did not show any significant differences in *in vitro* cultures or in C57BL/6 mice inoculated intraperitoneally. In contrast, following the intracranial inoculation of mice, viral replication in the brain was higher for EgCME-E-I159V than for the parental strain EgCME. The mutation also increased levels of CD3+ and CD8+ T cells in the brain, suggesting that residue 159 of the E protein modulates WNV pathogenicity by influencing both viral replication and T-cell recruitment [111].

Zhang et al. [112] generated mutations in the E protein of the WNV that are known to mitigate virulence in other flaviviruses. From an IC of NY99, they created mutants in three regions; namely, the fusion loop (L107F), the receptor-binding domain III (A316V), and a stem helix (K440R). Neuroinvasion and neurovirulence of WNV NY99 IC-derived viruses and engineered variants encoding E protein substitutions were characterized in 3- to 4-week-old female NIH Swiss mice. The results showed that only the L107F mutation could reduce neuroinvasiveness without affecting neurovirulence.

Similarly, Kaiser et al. [113] studied a mutation in the E protein implicated in attenuated JEV phenotypes. JEV and WNV are closely related flaviviruses. Because the E-E138K mutation induced a decrease in JEV virulence, Kaiser et al. tested this mutation for WNV. *In vitro* studies performed on Vero and A549 cells showed that the multiplication kinetics of IC NY99 and the mutant E-E138K were similar. *In vivo* experiments in mice confirmed these results; that is, that the mutation did not decrease WNV virulence, whereas it did so for JEV. Indeed, the E-E138K mutation attenuated neither WNV neuroinvasion nor neurovirulence. This result underscores that differences in molecular virulence determinants exist between flaviviruses.

2.3. Non-Structural Proteins

2.3.1. NS1 Protein

The NS1 glycoprotein is highly conserved among flaviviruses, with a molecular weight ranging from 46 to 55 kDa. NS1 has three N-glycosylation sites and exists as a monomer, a dimer (membrane-bound protein, mNS1), and a hexamer (secreted protein, sNS1). Its mature form is a homodimer [114], which is transported to the cell surface and acts as an immunomodulatory protein by decreasing the activity of the complement system [115]. NS1 plays a role in the modulation of host innate immunity and in viral replication. It is also a target for the generation of attenuated vaccines as well as a biomarker for viral diagnosis [116,117].

Flaviviruses share highly conserved NS1 N-glycosylation sites (N-X-S/T). Instead of presenting two glycosylation sites like other flaviviruses, WNV possesses three glycosylation sites on NS1 [116]. Whiteman et al. [116] wanted to develop an attenuated vaccine based on NS1 protein glycosylation mutants and used site-directed mutagenesis to generate the mutants NS1-N130A, NS1-N175A, and NS1-N207A. In parallel, a mutant lacking E and NS1 N-glycosylation sites was created (E-154S/NS1-N130A/NS1-N175A/NS1-N207A), based on evidence that E protein glycosylation decreases neurovirulence in mice [102]. The goal was to see whether the removal of glycosylation sites on both proteins further decreased the virulence. To this end, the *in vitro* infection kinetics of the

NS1-130A/175A/207A and E-154S/NS1-130A/175A/207A mutants were compared with those of E-154S and the parental IC in Vero cells, P38801 mouse macrophages, and Neuro2A neuroblastoma cells. A number of differences were evidenced between the mutants and the parental IC in the three cell lines. Significant differences were observed between the IC and both E-154S and E-154S/NS1-130A/175A/207A in Vero cells at 48 h, 72 h, and 96 h pi and between E-154S and E-154S/NS1-130A/175A/207A in P38801 macrophages at 72 h and 96 h pi.

An *in vivo* study in NIH Swiss mice showed that, among the single glycosylation mutants, only the NS1-175A was significantly less neuroinvasive than the NY99 parental strain. Two other mutants, NS1-130A/207A and NS1-130A/175A/207A, were highly attenuated for neuroinvasion (with lethal dose 50 (LD₅₀) 3000–50,000 fold higher than the parental NY99). The addition of the E-154S mutation (E-154S/NS1-130A/175A/207A) strongly decreased the neurovirulence and neuroinvasiveness. This study demonstrated that NS1 mutations did not affect the *in vitro* phenotype of the virus strains. In contrast, the higher the number of NS1 mutations, the greater was the impact on neuroinvasiveness and neurovirulence in mice. The combination of multiple NS1 mutations and the E-154S mutation (E-154S/NS1-130A/175A/207A) resulted in an attenuation for both neuroinvasiveness and neurovirulence [116].

WNV lineage 2 virulence determinants have been less investigated as these viruses only induced mild clinical signs in the past [118]. However, horses started developing encephalitis due to infection by WNV lineage 2 in 2009 [35]. A study conducted in 2016 focused on mutations implicated in WNV lineage 2 virulence, based on results obtained with the central European lineage 2 isolate 578/10 [119]. Indeed, the P250L mutation in 578/10 induced a modification in the structure of the polypeptide that inhibited the formation of NS1 dimers, leading to a decrease in viral replication *in vitro* on Vero cells [120] as well as neuroinvasiveness *in vivo* in C57BL/6 mice following intracerebral inoculation.

2.3.2. NS2 Protein

NS2A is a small, multi-functional, hydrophobic protein of 22 kDa involved in RNA replication. NS2A binds to components of the replication complex, to the 3'UTR region of viral RNA, as well as to proteins NS3 and NS5 [121]. NS2A has a role in modulating the host antiviral IFN type I (IFN α/β) response [122–124]. NS2B protein (14 kDa) is a co-factor of the NS3 protease with the NS2B and NS3 proteins forming a complex in infected cells [125–127].

IFN α/β are essential components of the immune response following viral infection. Control of IFN α/β induction and signaling is therefore essential for virus replication and transmission. Liu and colleagues (2004) investigated the NS2A-A30P mutation in the Kunjin virus. The mutation abolished the capacity of NS2A to inhibit the IFN- β promoter-driven transcription of ISGs (interferon-stimulated genes) during WNV infection [122]. Other studies suggested that other mutations, such as NS2A-D73H and NS2A-M108K [128], or the KUN/NY99 NS2A point mutations A112V, Y119H, M129I, C168R, F212L, and V223I [91], could contribute to NS2A's reduced capacity to counteract the antiviral response. Further investigations are needed to identify the critical elements in the modulation of the IFN response.

2.3.3. NS3 Protein

NS3 is a multi-domain protein of 70 kDa, with an N-ter protease that constitutes the catalytic domain of the NS2B-NS3 serine protease complex and is known to play a role in cleaving the NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, and NS4B/NS5 junctions. This N-ter region is also involved in the generation of the C-ter region of the mature capsid and NS4A proteins. NS3 C-ter portion contains the RNA triphosphatase and RNA helicase activities involved in genome capping and viral RNA synthesis and viral replication, respectively [129,130].

Ebel et al. [131] investigated the viral determinants of pathogenesis in mice and viral fitness in mosquitoes and birds, focusing on the RNA helicase domain of the NS3 protein. Because the Asp483 residue is highly conserved among flaviviruses causing encephalitis, such as WNV, TBEV, or JEV, but not in dengue or yellow fever viruses associated with hemorrhagic syndromes [132],

it was considered as a possible determinant of neurovirulence and/or neuroinvasion. The mutation of this amino acid was detected in a virus strain attenuated for mice after 20 passages in mosquitoes. The authors reproduced this mutation by reverse genetics and showed that it strongly reduces fitness in vertebrates (chickens), while having little effect on fitness in invertebrate (mosquito) hosts.

Brault et al. [133] have identified a proline within the helicase domain of NS3 at position 249 that is a critical genetic determinant of WNV pathogenesis in American crows. Langevin's group [134] evaluated the impact of NS3-249 variants on avian and mammalian virulence. They generated viruses presenting multiple amino acid substitutions and inoculated them into two bird species (American crows and house sparrows) and in CD-1 mice. The WNV NS3-249P mutant induced a higher viremia and mortality than the parental WNV NY99 only in the two avian species tested. No difference was seen in mice. This could suggest that this genetic determinant of virulence is specific to avian species.

Moreover, Sotelo et al. [135] showed that NS3-249 is not the only molecular determinant of virulence for WNV strains bearing glycosylated E. They inoculated different strains of WNV lineage 1 (Spain 2007 (GenBank n° FJ766331), Morocco 2003 (GenBank n° AY701413), and NY99 (GenBank n° FJ151394) into CD-1 mice by the intraperitoneal route. These WNV strains bear either a proline (Spain 2007, NY99) or threonine (Morocco 2003) at position NS3-249. At the dose of 100 PFU, the authors observed 100% mortality regardless of the strain inoculated. At 1 and 10 PFU, however, different clinical outcomes were observed for the three strains. The LD50 was lower for the Morocco 2003 and NY99 strains (1.78 and 2.31 PFU/mL, respectively), while a higher LD50 was observed for WNV Spain 2007 (18 PFU/mL). Consequently, the WNV Morocco 2003 (with a T at NS3-249) was more virulent in mice than WNV Spain 2007 (with P at NS3-249). These results suggest that the amino acid residues at not only position 249 but also at other positions play a role in WNV virulence in mice.

2.3.4. NS4 Protein

NS4A and NS4B are small (16 kDa and 27 kDa) hydrophobic proteins. NS4A plays a role in the virus replication process and may act as a cofactor regulating the ATPase activity of the NS3 helicase [136,137]. NS4B plays a role in immune evasion through inhibition of WNV IFN signaling [138,139] and may also play a role in viral replication [139].

The hydrophobic NS4A protein interacts with cellular membranes through four internal hydrophobic domains. Its N-ter domain is exposed at the cytoplasmic side of ER membranes, such as the NS3 helicase domain. Several studies have demonstrated that NS3-NS4A binding plays a role in polyprotein processing of yellow fever and dengue flaviviruses [140]. Based on these observations, Shiryayev et al. investigated nucleotide changes in the NS4A protein and their impact on NS3 helicase activity by measuring the ATPase activity. The introduction of NS4A-Q46K/Q47K/D50K mutations abolished the ATP-saving functions of NS4A. Taken together, these results suggest that NS4A is essential for optimal performance of the helicase activity of NS3 [136].

Several publications have described mutations in the NS4B protein in attenuated and passage-adapted mosquito-borne flaviviruses [141–143]. Sequence alignment of multiple flaviviruses showed that these mutations occurred in the same region of the protein. Wicker and colleagues [144] investigated the role of the four cysteine residues (102, 120, 227, and 237) of the NS4B protein using the WNV as a model. They specifically identified the serine–cysteine substitution at position 102 as key to conferring an attenuated phenotype in NIH Swiss mouse models. In vitro, this mutation induced thermosensitivity of the mutant WNV in Vero cells at 41 °C. Other mutations at residues 77 and 125 of the NS4B of DENV serotype 2 were identified as essential to inhibit IFN signaling. It is therefore tempting to consider that the C102S mutation, located in the same region, may play a role in the IFN signaling cascade.

Puig-Basagoiti and colleagues [145] established the adaptive mutation of the Glu to Gly at position 249 (E249G) in the C-ter tail of NS4B as being important for conferring an attenuated phenotype of WNV in mammalian cell cultures and in vivo in mice. In mosquito cells, however, no differences were noted between the parental and mutant virus. Of note, this mutation was also identified in a strain

isolated from birds (WNV Texas 2003), which displayed attenuated virulence compared with WNV NY99 [146].

In the N-ter region of NS4B, several residues are conserved among the WNV strains (D35, P38, W42, and Y45). Wicker and colleagues demonstrated a role for the proline residue at position 38 in WNV virulence in mammals. The engineered P38G mutant virus was found to contain additional NS4B T116I and NS3 N480H substitutions. The importance of the P38G mutation in the virulence and viral replication was demonstrated *in vitro* on different cell lines and also in mice [139].

2.3.5. NS5 Protein

The NS5 protein is the largest NS protein (103 kDa) and comprises a N-ter methyltransferase (MTase) and a C-ter RNA-dependent RNA polymerase [147]. By consequence, NS5 is pivotal for flavivirus replication. NS5 catalyzes sequential methylation of a guanine N-7 residue and a ribose 2'O site to generate a type 1 cap on the 5' end of viral RNA [148].

Davis et al. [149] published complementary data on the NS4B-E249G substitution mutation. They demonstrated that the substitution of alanine by valine at position 804 in the C-ter domain of NS5 confers an attenuated phenotype of WNV in cell culture and *in vivo* in mice.

Several studies [148,150–153] have addressed the MTase activity of NS5, and have served to identify three stable attenuating mutations that abolish 2'O methylation activity (K61A, K182A, and E218A). These mutants, however, retain varying degrees of N-7 methyltransferase activity, which seems to be sufficient for virus viability [153].

Kaiser and colleagues investigated different single NS5 mutants, including NS5-K61A and NS5-E218A, as well as the double mutant NS5-K61A/E218A, in the framework of a NY99 IC. Although each single mutant was attenuated for neuroinvasiveness in NIH Swiss Webster mice, the double mutant was not, though the mice survived for a longer period than those challenged with the parental NY99 strain. This unexpected result was due to the reversion of the double mutant at both mutation sites. To demonstrate the reversion of this double mutant, Kaiser et al. realized next-generation sequencing on the double mutant viral stock after many passages on Vero cells. At P0, 3.3% of viral stock presented the A61K reversion and 2.8% the A218E reversion. After one passage, the A61K reversion was detected in 5% of the viral population and A218E in 4.1%. Finally, at passage 5 on Vero cells, the A61K and A218E reversions made up 41% and 47.6%, respectively, of the population. Nonetheless, the NS5-K61A and NS5-E218A mutations in the N-ter methyltransferase domain of NS5 are important virulence determinants of the WNV and appear to be promising targets to generate candidate live WNV vaccines [154].

2.4. The 3'UTR Non-Coding Region

The 5' and 3' UTR flanking the single ORF of flaviviruses act as important regulators of viral genome replication and translation. They contain highly elaborated secondary structures [155]. The 3'UTR of flaviviruses ranges between 380 to 600 nt in length and can be divided into three domains: a highly variable proximal domain 1 that follows the stop codon, a second domain 2 with a moderately conserved sequence and a number of stem-loops and dumbbell structures, and the highly conserved distal domain 3 [156].

In addition to the full-length genomic RNA (gRNA), an RNA sequence of approximately 0.5 kb—called subgenomic flaviviral RNA (sfrRNA)—has been detected in flavivirus-infected cells [157, 158]. Recent studies have shown that sfrRNA is a degradation product generated by a host enzyme, probably the 5'-3' exoribonuclease XRN1 [158,159]. It is thought that complete degradation of gRNA by XRN1 may be prevented by the 3'UTR secondary structure. The generation of sfrRNA plays a role in WNV virulence [160]. A study conducted by Roby and colleagues [156] demonstrated that deletion mutants of WNV incapable of producing sfrRNA were attenuated both in cell culture and *in vivo* in mice.

Davis and colleagues [149] sought mutations in the 3' UTR involved in WNV virulence. They determined that the following substitutions—3'UTR-A10596G/C10774U/A10799G—did not by themselves change the WNV phenotype. However, WNV virulence was attenuated when these three mutations occurred simultaneously with the NS4B-E249G mutation.

3. Avian Model

In many bird species, the level of viremia is sufficient to infect mosquitoes. They are not only reservoirs of WNV but also amplifiers of the virus and a source of infection for dead-end-hosts. Severe WNV disease has been diagnosed in Accipitriformes and Passeriformes, and among the latter, especially in Corvidae. Clinical signs in susceptible species include ruffled feathers, lethargy, ataxia, inability to fly, seizures, and unusual postures.

A variety of wild bird species (at least 77 species belonging to 29 families and 12 orders) have been experimentally inoculated with different WNVs to estimate their host competence and to study WNV pathogenesis and virulence [49]. Passeriformes and Charadriiformes are considered to be highly competent hosts [48]. The virulence determinants of WNV have mainly been characterized in the American crow (AMCR) (*Corvus brachyrhynchos*), house sparrow (HOSP) (*Passer domesticus*), red-legged partridge (*Alectoris rufa*) [49], house finch (HOFI) (*Haemorrhous mexicanus*), and young specific-pathogen-free (SPF) chicks (*Gallus gallus domesticus*) [161,162]. Host competence should be considered when evaluating WNV fitness and virulence in birds [49]. Bird species with low (chicken), moderate, and high (AMCRs and HOSPs) competence will differentially replicate the WNV and, consequently, evaluation of virulence factors in vivo will be influenced to some extent by the bird species used. The geographic distribution and abundance of avian species will also influence the amplification and transmission dynamics locally. Only a few of the identified molecular determinants of virulence identified in mice have been confirmed in natural avian hosts (Table 1 and Figure 7).

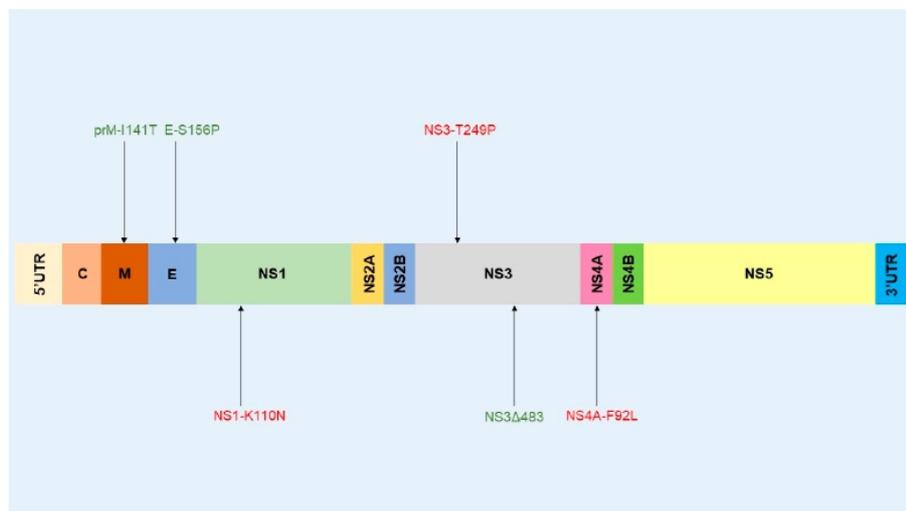


Figure 7. Virulence determinants in the WNV genome found in avian hosts. Molecular virulence determinants validated in vitro in the DEF avian cell line or in vivo in American crows, house sparrows, red-legged partridges, and specific-pathogen-free (SPF) chickens. Green: mutations involved in attenuated viral phenotype. Red: mutations involved in more virulent viral phenotype.

Table 1. Comparison of molecular virulence determinants of WNV in mammalian, avian, and insect models. The table details most of the residues involved in virulence variation in vivo and in vitro, as well as mutations or deletions most often observed. Green: mutations that decrease virulence. Red: mutation that increase virulence.

	Mammals Model		Avian Model		Insect Model	
	nucleotides involved/mutation/deletion	effect	nucleotides involved/mutation/deletion	effect	nucleotides involved/mutation/deletion	effect
5'UTR	5'UTR (nt 50-52)					
prM/M	prM-N15Q	decreases viral RNA quantity	prM-I141T	decreases virulence		
	M-I36F	small plaque phen., att phen.				
	M-A43G	small plaque phen., att phen.				
E	glyE+ (nt 154-156)	increases neuroinv., neurovit.	E-S156P (glyE-)	decreases viremia	E-N154I (glyE-)	decreases viral repli.
	E-I107F					
	E-I159					
	E-A316V/E	decreases virulence				
	E-K440R	decreases virulence				
NS1	NS1-N130A	stop neuroinv.	NS1-K110N	enhance viral temp. resistance	NS1-I30-132QQA	decreases infection, dissem., transm.
	NS1-N175A	stop neuroinv. & neurovit.			NS1-I75A	decreases infection, dissem., transm.
	NS1-N207A	stop neuroinv.			NS1-207A	decreases infection, dissem., transm.
	NS1-P250L	decreases viral titer and stop neuroinv.				
NS2	NS2A-A30P	decreases viral repli., att. for neuroinv. and neurovit.				
NS3	NS3 Δ 483	decreases mortality	NS3 Δ 483	decreases virulence	NS3 Δ 483	decreases fitness
	NS3-249		NS3-T249P	decreases virulence		
			NS4A-F92L	enhance viral temp. resistance	NS4A-T116A	
NS4	NS4A-E46K					
	NS4A-E47K					
	NS4A-D50K					
	NS4B-C102S	temp. sens., decreases neuroinv. and neurovit.			NS4B-C102S	better mosquito transm.
NS5	NS4B-E249G	decreases viral repli. and mortality			NS4B-E249G	
	NS4B-I38G	temp. sens., small plaque, decreases mortality			NS4A-P38C/A	better mosquito transm.
	NS5-A804V	att. for neuroinv.				
	NS5-K61A	decreases repli., no lethality				
	NS5-K182A	decreases repli.				
3'UTR	NS5-E218A	decreases repli., no lethality				
	NS5-D146A	decreases repli.				
	3'UTR-A10596G	decreases virulence				
	3'UTR-C10774U	decreases virulence				
	3'UTRA10799G	decreases virulence				

3.1. Structural Proteins

3.1.1. E Protein

Several studies [76,163] have confirmed the role of glycosylation of the E protein in viral pathogenicity in birds, both in vitro (on avian cells) and in vivo (on two-day old chicken). Brault et al. [71] confirmed that Mexican variants of WNV with a glycosylated E motif (E-P156S) produced a higher viremia and shorter survival time in American crows and house sparrows, thereby defining the glycosylation state of E protein as a virulence determinant in birds. However, strains that are non-neuroinvasive in mice cause significant mortality in birds, suggesting that mechanisms of virulence and attenuation may vary between vertebrate hosts. Therefore, results acquired in mouse models may not accurately predict virulence in birds. Moreover, among avian species, results obtained in a given species cannot be transported to other susceptible species and need to be assessed experimentally.

3.1.2. prM Protein

In comparison with the highly virulent NY99 strain, the strains isolated in Mexico, Central America, or South America in 2003 were attenuated [164–166]. A study conducted by Brault and colleagues in 2011, found that the WNV Mexican variants, whether the E protein was glycosylated or not, were less virulent than the NY99 strain, suggesting that other determinants impact the virulence in the avian model. Langevin et al. generated chimeric mutants between the Mexican and the NY99 strains and inoculated them into three bird species (AMCRs, HOSPs, and HOFIs). They demonstrated that the prM-I141T and E-S156P mutations decrease WNV NY99 virulence and that the reciprocal mutations prM-T141I and E-P156S raise the virulence of the Mexican strain in birds [162].

3.2. Non-Structural Proteins

3.2.1. NS1, NS2, and NS4 Proteins

Andrade et al. [167] evaluated temperature sensitivity using WNV NY99 and COAV997 (WNV California 2003) strains that differed at five non-synonymous mutations. They infected duck embryonic fibroblasts (DEF) cells with parental and chimeric viruses at three temperatures, 37 °C, 41 °C, and 44 °C, corresponding to temperatures observed in birds that are slightly, moderately, and severely ill, respectively [168]. They observed that the NS1-K110N and the NS4A-F92L substitutions in WNV NY99 decreased cell growth only at 44 °C. These results highlight the importance of residues 110 (asparagine) of the NS1 protein and 92 (phenylalanine) of the NS4A protein in WNV infection of avian cells. A similar test was carried out in vitro on *Aedes albopictus* mosquito cells (C6/36) by studying infection at 22 °C, 28 °C, and 34 °C, corresponding to temperatures typical of spring, early summer, and summer, respectively. No differences were observed in C6/36 cells, suggesting that certain genomic regions could be involved in temperature adaptation in the host but not in the vector.

The NY99 strain has been extensively studied and is widely used as a model strain for WNV studies. An alternative lineage 1 WNV strain isolated in Kenya (WNV KN3829) shows only eleven amino-acid differences with the NY99 strain. The two strains exhibit a different virulence phenotype in American crows. Although NS3 studies show the importance of the NS3-249T substitution in attenuation of WNV virulence in birds, viremia was lower for the KN3829 parental strain and KN3829-T249P mutant than the NY99-P249T and NY99 strains, respectively, suggesting the importance of other mutations for the avian virulence phenotype. Dietrich et al. [169] focused on the role of NS1 and NS2 proteins in addition to the NS3-P249T substitution in bird virulence. In an in vivo study, viremia was shown to be higher for mutants having either a proline or a threonine residue at position 249 in the NS3 protein along with the NS1 and NS2B regions of NY99, than for the parental viruses. These regions differ by three residues between the two strains (residues 70 of NS1; 52 and 103 of NS2). Site-directed mutagenesis was then used to replace low virulence strain residues with those of a high virulence strain (NS1-S70A, NS2A-A52T, and NS2B-A103V). Significant differences were not observed in vivo, whether

for viremia or mortality, suggesting that the difference in virulence does not depend on a single residue. They also evaluated the temperature sensitivity of WNV NY99, KN3829, and the chimeric mutants thereof. They infected peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of AMCR and DEF at different temperatures. Replacement of the NS1-NS2B region of KN3829 by the corresponding fragment of NY99 increased the viral titer in DEF.

These results show that differences in the NS1 and NS2B region may influence the pathogenicity of WNV in bird models, independently of the NS3-249 substitution. Moreover, it seems that modification of the NS1 and NS2B proteins impacts the strain-specific temperature sensitivity. However, the temperature of viral replication directly influences the capacity of the WNV to infect vectors and hosts. Indeed, to increase the probability of survival, WNV has to be able to replicate at temperatures ranging from 14 °C (minimal temperature for mosquito life cycle) to 45 °C (maximal temperature of febrile bird). It is frequently observed that a poor in vitro adaptation of viral strains to different temperatures is correlated with an attenuated virulence phenotype in vivo [170–172].

3.2.2. NS3 Protein

The NS3-T249P is present in many WNV strains that have caused major outbreaks in humans, such as in Egypt (1950), Romania (1996), Russia (1996), New York (1999), and Israel (1997–1998) [134].

Brault and colleagues also identified the NS3-249P residue as a critical determinant of WNV virulence in American crows. To this end, they compared the viremia of AMCRs infected with WNV NY99 (highly virulent), KN3829 (attenuated strain), and the mutants NY99-P249T and KN3829-T249P [133,173]. The attenuated strain KN3829 and the mutant NY99-P249T gave rise to a low level, delayed viremia at day 3 pi, compared with high titers obtained for NY99 and KN3829-T249P. However, studies conducted by Langevin et al. in 2005 and Sotelo et al. in 2011 in other avian species, HOSPs and red-legged partridges, respectively, did not validate these results. This observation suggests that results obtained in a given species cannot be transported to other susceptible avian species and need to be validated experimentally.

Langevin and colleagues demonstrated that, depending on the nature of the substitution at position 249 of NS3 (tested substitutions: NS3-P249A, NS3-P249D, NS3-P249H, and NS3-P249T), in vivo virulence in AMCRs and HOSPs is differentially affected. No differences in viremia was observed in AMCRs infected with NS3-P249D and NS3-P249H mutants or the parental strain NS3-249P. The NS3-P249T mutation, however, drastically reduced the viremia and diminished the lethality. Modification of the NS3-249 residue had an impact on viremia in HOSPs. Unlike observations made in AMCRs, the NS3-249T mutant produced a higher viral titer than the NS3-249P mutant, but rapidly declined at 3 dpi. These results confirm the importance of the NS3-249 residue in avian virulence, especially in the Israelo-American clade, which is the only group of lineage 1 WNV strains with high pathogenicity in birds [134]. Dridi's group [73] also investigated the NS3-249P residue. They performed an in vivo experiment in young SPF chickens, inoculated with three different lineage 2 WNV strains: Hun2004 and Aus 2008, which have a NS3-249H residue, and Gr2011, which has a NS3-249P residue. After subcutaneous inoculation, viremia peaked for all viruses at 2 dpi. However, for Gr2011, an infectious virus could only be detected at this time point. Moreover, the infectious titer was significantly higher for Hun2004 and Aus2008 than for Gr2011. These results show that, despite its NS3-249P residue, Gr2011 is less virulent than the other strains tested. That could suggest that NS3-249P is neither sufficient nor necessary for WNV virulence in birds.

Viral fitness was evaluated by Ebel et al. [131] in mosquitos and chicken. Competitive inoculation of both wild-type WNV and mutant NS3 Δ 483 showed that the NS3 Δ 483 mutant was outcompeted by wt WNV in chickens, suggesting a role for NS3 helicase activity in WNV virulence.

4. Insect Model

Using the mosquito as an in vivo model can be complex depending on the route used to inoculate the virus. Experimental techniques for WNV infection in mosquitoes vary from thoracic microinjection

and membrane blood feeding to blood feeding directly on mice [174]. The origin of the blood source is also an important criterion in the study of vector competence of mosquitoes. Avian blood, especially chicken blood, is ideal [68]. Experimental infections with WNV in mosquito vectors have mainly been performed to assess the replication efficacy in mosquito hosts and therefore deduce virus circulation in the natural enzootic transmission cycle. Studies of WNV virulence have first addressed multiplication and dissemination of WNV variants in vitro in cell lines, essentially on C6/36 (*Ae. albopictus* cells), and then sought confirmation in vivo, mainly in *Cx. pipiens* mosquitoes. Other studies have been performed on *Ae. albopictus*, *Ae. caspius*, *Ae. detritus*, and *Cx. modestus* [68].

4.1. Structural Proteins

E Protein

Murata et al. examined the role of glycosylation of the E protein in viral dissemination and replication for two mutant viruses, 6-LP (S156, glyE+, GenBank No. AB185914) and 6-SP (P156, glyE-, GenBank No. AB185915) in C6/36 cells and in vivo in *Cx. pipiens*. In vitro temperature sensitivity tests and in vivo experiments revealed that the mutations had no effect on multiplication and dissemination of WNV [64]. Therefore, glycosylation of the E protein is not critical for the virus to propagate and disseminate within the vector, at least when the virus is inoculated intrathoracically into mosquito hemolymph so as to bypass the midgut barrier [110].

Another study conducted by Moudy et al. [175] focused on the N154I substitution within the E protein of WNV NY99. No differences were observed between the parental and mutant virus. These results do not agree with conclusions from previous studies [92,176], which demonstrated a 10-fold decrease in WNV titers in mosquito cells. This difference could possibly be explained by the strain of WNV used. In vivo experiments were performed on *Culex pipiens* and *Culex tarsalis*. The authors tested two inoculation routes (perioral and intrathoracic) to infect female mosquitoes, in which the inoculation route, replication of the NY99 N154I variant, was lower than that of the parental virus in the two mosquito species tested. This result highlights the importance of the asparagine residue at position 154 of the E protein in WNV replication in mosquitoes. The currently known genetic determinants of virulence in mosquitoes are represented in Figure 8.

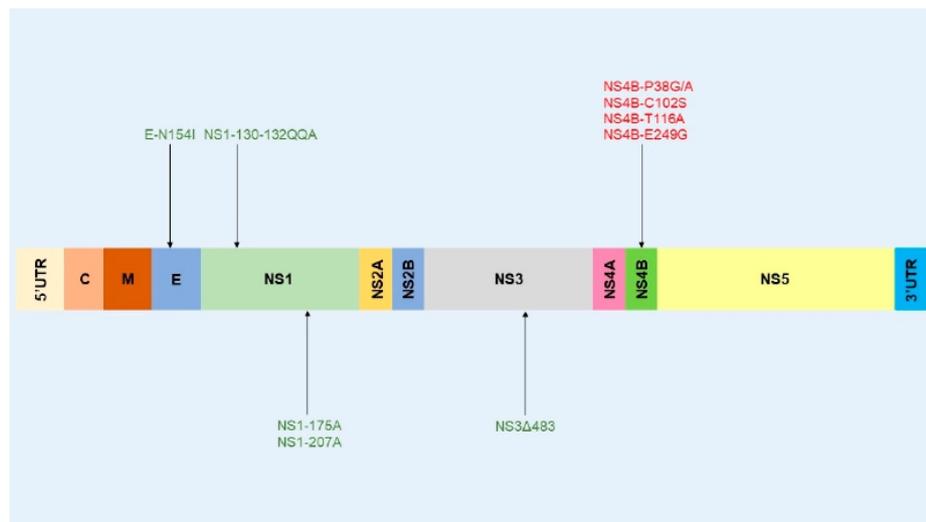


Figure 8. Virulence determinants in the WNV genome found in mosquito vectors. Molecular virulence determinants validated in vitro in the C6/36 mosquito cell line or in vivo in *Culex pipiens* and *Culex tarsalis*. Green: mutations involved in attenuated viral phenotype. Red: mutations involved in more virulent viral phenotype.

4.2. Non-Structural Proteins

4.2.1. NS1 and E Protein Glycosylation

Van Slyke and colleagues [177] carried out in vivo experiments to study vector competence of *Culex tarsalis*. They investigated three mutations that remove NS1 glycosylation (NS1-130-132QQA/175A/207A) alone or in addition to ablation of the glycosylation site of the E protein (E154S-NS1-130A/175A/207A). Both mutants were attenuated for vector competence in *Culex tarsalis*. Infection, dissemination, and transmission were more impaired for the NS1-130-132QQA/175A/207A mutant than for the mutant E154S-NS1-130A/175A/207A. The NS1 glycosylation is therefore an important determinant for WNV dissemination and transmission in *Culex tarsalis*.

4.2.2. NS3 Protein

Ebel et al. [131] evaluated the fitness of the WNV NS3 Δ 483 mutant in *Culex quinquefasciatus*. A lower to moderate fitness was observed for the mutant WNV compared with that of the parental counterpart. The authors also demonstrated reduced fitness for the WNV NS3 Δ 483 mutant in chicken. The RNA helicase of NS3 thus plays a role in fitness in both avian and mosquito hosts.

4.2.3. NS4 Protein

Van Slyke et al. [177] studied the impact of several mutations in NS4B (NS4B-P38G/T116A, NS4B-C102S, NS4B-P38A, and NS4B-E249G) on the vector competence of *Culex tarsalis*. They found that all the NS4B mutations increased the vector competence of *Culex tarsalis*, as evidenced by a higher infection rate, dissemination, and transmission for these viruses. These results are discordant with observations in mammals in which the corresponding NS4B mutants had attenuated phenotypes in neurovirulence [144].

5. Discussion

WNV is expanding across Europe and other continents. It re-emerged in Europe during the summers of 2016–2018, with an increase in reported autochthonous cases (ECDC, update 9 November 2018). This flavivirus is maintained in an enzootic cycle involving different species of birds and mosquitoes with humans and horses identified as dead-end hosts [47,48,178]. It is important to acquire better clarification for several aspects of WNV circulation, including genomic diversity, pathogenicity, and transmissibility of the WNV strain. Many studies have provided insight into the profile of circulating WNV isolates. Some isolates from birds and mosquitoes are naturally attenuated [146,179]. For instance, strains isolated in Texas (Houston) in 2003 are temperature sensitive and attenuated in mice and birds. Genomic sequence analyses did not identify specific mutations related to this phenotype. Authors have described the NS4B E249G substitution and additional mutations such as prM-N4D and NS5 A804V, all or most of which are present in all but a few of these attenuated isolates. Therefore, natural attenuation probably relies on the accumulation of multiple specific mutations in different parts of the genome. Thanks to reverse genetic technologies and site-directed mutagenesis, research groups have successfully investigated the impact of individual mutations engineered in the structural, prM/M, and E genes, and non-structural NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS4B, and NS5 genes.

WNV is biologically diverse, with up to eight different lineages proposed. The majority of the studies performed to identify the critical molecular determinants of virulence have used WNV NY99 as a reference strain. It would be therefore of great interest to look for molecular determinants of virulence in WNV strains isolated more recently in Africa, Europe, and Australia. The identification of virulence determinants is a key step in understanding WNV pathogenesis and in designing preventive and therapeutic tools. The study of genetic expression, replication, and pathogenesis of flavivirus, especially WNV, has been facilitated by the improvement of reverse genetic technologies. In order to overcome the toxicity of full-length cDNA in bacteria, various approaches have been employed, such as long PCR, CPEC, ISA, and ISA-derived methods [83]. These methods allow rapid

generation of infectious flavivirus cDNA. The production of such tools was essential in acquiring the current high level of knowledge about flavivirus virulence determinants. Most studies were initially undertaken in mouse models but rapidly the research community moved on to assess WNV virulence in more relevant models, especially birds, the natural hosts of the virus, and its vectors, especially *Culex* spp. mosquitoes. A review edited by Kaiser and colleagues [88] summarized the key molecular determinants implicated in WNV virulence in mammals and mosquitoes. Four years later, the present review updates the current understanding of the virulence determinants of WNV in mammals, birds, and mosquitoes, and provides a comparison of the differences observed between the three models and with other flaviviruses (Table 2). Several groups have compared the role of critical virulence determinants in the three models. Such is the case of Murata and colleagues [76], who focused on the glycosylation state of the E protein. In vitro experiments performed in mammalian, avian, and mosquito cell lines demonstrated that the WNV gly+E protein is temperature-sensitive in vertebrate cells only. These results were validated in vivo. Glycosylation of the E protein increased the virulence in avian and mammalian hosts but had no impact on the replication and dissemination in *Culex pipiens*. Another group [131] focused on the NS3 protein, especially NS3 Δ 483. This deletion is conserved in other flaviviruses, causing encephalitis such as TBEV and JEV, but not in dengue and yellow fever virus [132]. They observed an attenuated phenotype in mice, and a decreased fitness of WNV in birds and mosquitoes. These two studies highlighted the necessity to perform comparative studies in the natural hosts and reservoirs of WNV to appreciate the global impact of mutations in WNV pathogenesis. In addition, the dynamics and stability of virulent/non virulent mutations through serial cross-passages in mammalian/avian/arthropod hosts would deserve further studies. Researchers now have a robust inventory of specific virulence determinants across most of the WNV genome underpinned by phenotypic studies in vertebrate and/or invertebrate hosts/reservoirs. The identification of key mutations accounting for WNV attenuation and pathogenesis need to be pursued. The proper characterization of virulence determinants requires an extensive analysis of the modifications induced in the complete gene-product and its effect on neuroinvasiveness, tissue tropism by immunohistochemistry, and immunopathogenesis. It would be interesting to start investigating the impact of combined mutations in several genes. Indeed, according to the phenotypic studies conducted on WNV isolates, the level of virulence depends upon multiple sites in the genome. This would help in elucidating the pathobiological mechanisms of flavivirus infection that underline the virulence determinants. This approach, combined with reverse genetic and site-directed mutagenesis, would be useful for design of a safer WNV vaccine containing the mutations of interest.

Table 2. Comparison of molecular virulence determinants among flaviviruses. The table details residues involved in virulence variation in vivo and in vitro and shared by at least two flaviviruses. TBEV: tick-borne encephalitis virus; DENV: dengue virus; ZIKV: zika virus; YFV yellow fever virus; JEV: Japanese encephalitis virus; MVEV: Murray valley encephalitis virus [92,97,99,102,106–108,112,113,116,177,180–206].

Location	Virus(es)	Residues	Similar Residues in WNV Genome	Effects	References		
prM/M	prM glycosylation sites	TBEV	D143, R144	N15	ablation of prM glycosylation sites impacts virus assembly and infectivity and enhances TBEV neurovirulence	[92,180]	
	ApoptoM	DENV, YFV	L36	I36	modulates the death-promoting activity of M, virus replication and neurovirulence	[97,99,181]	
	Domain I (N-glycosylation site)	TBEV ZIKV ZIKV	N154 T156 154–157	154–157	modulates virus secretion from infected cells and virus infectivity in mammalian cells but not in arthropod cells, as well as virus replication and neuroinvasiveness in vivo models	[182] [183] [102,106–108,184]	
Hinge region linking Domains I and II	JEV, DENV, YFV	E49 (JEV), Q52	not investigated on WNV	impairs endocytosis and modulates neuroinvasiveness and neurovirulence	[185–188]		
	JEV	E138K	E138	reduces virus replication, neuroinvasion and neurovirulence for JEV; neurovirulence not affected for WNV and residue prone to rapid reversion in WNV	[113,186,189]		
E	Domain II (fusion peptide)	JEV, YFV	L107F	L107	impairs fusion, decreases viral growth in mammalian and insect cells and neuroinvasiveness in mice but does not affect neurovirulence	[112,116,187,190]	
		DENV	G102S, F108A			[191]	
	Domain III (receptor binding site)	JEV	E306K			[192]	
		YFV, DENV	S305F			[181,193–195]	
		TBEV	D308K	A316	influences binding to glycosaminoglycans (residues 325–326 and 380) or other cell receptors, modulates the efficacy of virus spread, neuroinvasiveness and neurovirulence - diminishes infection rates in Aedes aegypti mosquitoes (YFV), not studied in Culex mosquitoes	[197] [198]	
	YFV	S325F, E326K/R				[193,195,196]	
		YFV, MVEV	R380T			[193,194,199,200]	
	NS1	N-glycosylation site	DENV	N130A + N208A	N130 + N207	ablation of the first glycosylation site (N130) decreases replication, viral production and neurovirulence and diminishes vector competence of Culex tarsalis mosquitoes for WNV	[177,198]
			YFV	N130A + N208A		Decreased replication and neurovirulence (1st glycosylation site)	[116,201,202]
	3'UTR	Deletion of nucleotides	JEV	–27nt			[203]
DENV			–4 nt	not investigated on WNV	Attenuates or increases (TBEV) neurovirulence	[204,205]	
TBEV			–206 nt			[206]	

It would also be a good starting point to compare the virulence and pathogenesis of the WNV with those of other flaviviruses of interest, such as the dengue and yellow fever viruses [97]. It is noteworthy that the study of flavivirus molecular determinants has been driven by the identification in the field or by artificial selection of mutants with properties of interest, such as attenuation, neuroadaptation, and escape from neutralization. Much work [207] has been performed on *Culex*-borne JEV and WNV, *Aedes*-borne YFV and DENV, and tick-borne TBEV, while more limited datasets are available for other or recently emerging flaviviruses (ZIKV, for example). As a consequence, most of the molecular determinants shown to influence WNV, JEV, TBEV, MVEV, YFV, DENV, or ZIKV virulence or vector-borne transmission have only been studied for a single flavivirus [208,209]. Moreover, differences in the topology of NS proteins between flaviviruses, such as differences in NS2A aa residues exposed at the luminal side of the endoplasmic reticulum or in the cytoplasm of YFV and DENV infected cells, might explain, in part, the apparent variation in critical residues identified for different flaviviruses [210]. Of note, a comparison of the molecular determinants of flaviviruses has identified a number of these that are conserved in most flaviviruses, independent of the nature of the vector (mosquitoes vs. ticks, with TBEV) or of their tropism (neurotropism for JEV, WNV, and TBEV vs. viscerotropism for YFV and DENV (Table 2)); these shared determinants are likely to correspond to protein domains or functions that are critical for flavivirus biology, such as N-glycosylation domains in prM, E, and NS1, as well as E receptor-binding and fusion domains. Only one residue, E-138, has been shown to modulate the neurovirulence of JEV and WNV in a differential manner, as the E-E138K mutation diminished the neuropathogenicity of JEV in mice but had no impact on WNV [113,186,189] (Table 2). The identification of attenuating non-synonymous mutations that are conserved among flaviviruses could help in the rational design of attenuated vaccines against emerging flaviviruses, such as the Usutu or Zika viruses.

Finally, we actually face environmental changes (climate change, ecosystem changes due to biodiversity loss, and land-use modification). In response to global warming, bird species, some of them competent for WNV, may have to change their distribution area, possibly spreading WNV into new regions. In addition to altering the distribution of wildlife hosts, global warming will impact the mosquito distribution globally. Global warming will lead to the desertification of many regions that will become unfavorable to mosquitoes, but at the same time it could make temperate and cold regions more favorable to mosquitoes. In this context, WNV distribution may change in the coming years, leading to recurrent outbreaks in hitherto spared areas. We know that a fast reaction to a new outbreak is one of the best ways to control an epidemic. Thanks to modern molecular biology, viral genomes can be quickly sequenced. Detailed knowledge of the molecular determinants of virulence present in the viral genome would certainly help to anticipate the possible grade of WNV epidemics and, hence, properly implement control measures.

Author Contributions: Conceptualization, S.L. and G.G.; methodology, S.L. and G.G.; writing—original draft preparation, L.F. and G.G.; writing—review and editing, S.L., G.G., N.P., J.R. and E.A.; supervision, S.L., E.A., N.P. and G.G.; project administration, S.L. and E.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

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

References

1. Smithburn, K.C.; Hugues, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1-20*, 471–492. [[CrossRef](#)]
2. Zé-Zé, L.; Proença, P.; Osório, H.C.; Gomes, S.; Luz, T.; Parreira, P.; Fevereiro, M.; Alves, M.J. Human case of West Nile neuroinvasive disease in Portugal, summer 2015. *Euro Surveill.* **2015**, *20*. [[CrossRef](#)]
3. Lanciotti, R.S.; Roehrig, J.T.; Deubel, V.; Smith, J. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science* **1999**, *286*, 2333–2337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Ronca, S.E.; Murray, K.O.; Nolan, M.S. Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 325–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Petersen, L.R.; Hayes, E.B. West Nile virus in the Americas. *Med. Clin. N. Am.* **2008**, *92*, 1307–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zeller, H.G.; Schuffenecker, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *23*, 147–156. [[CrossRef](#)]
7. Blitvich, B.J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. *Anim. Health Res. Rev.* **2008**, *9*, 71–86. [[CrossRef](#)]
8. LaDeau, S.L.; Kilpatrick, A.M.; Marra, P.P. West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* **2007**, *447*, 710–713. [[CrossRef](#)]
9. Rossi, S.L.; Ross, T.M.; Evans, J.D. West Nile virus. *Clin. Lab. Med.* **2010**, *30*, 47–65. [[CrossRef](#)]
10. Lecollinet, S.; Pronost, S.; Couplier, M.; Beck, C.; Gonzalez, G.; Leblond, A.; Tritz, P. Viral Equine Encephalitis, a Growing Threat to the Horse Population in Europe? *Viruses* **2019**, *12*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Suthar, M.S.; Diamond, M.S.; Gale, M. West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 115–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tan, T.T.T.; Bhuvanankantham, R.; Li, J.; Howe, J.; Ng, M.-L. Tyrosine 78 of premembrane protein is essential for assembly of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1081–1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lindenbach, B.D.; Thiel, H.-J.; Rice, C.M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 1101–1152.
14. Pérez-Ramírez, E.; Llorente, F.; Amo, J.D. Pathogenicity evaluation of twelve West Nile virus strains belonging to four lineages from five continents in a mouse model: Discrimination between three pathogenicity categories. *J. Gen. Virol.* **2017**, *980*, 662–670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lanciotti, R.S.; Ebel, G.D.; Deubel, V.; Kerst, A.J.; Murri, S.; Meyer, R.; Bowen, M.; McKinney, N.; Morrill, W.E.; Crabtree, M.B.; et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology* **2002**, *298*, 96–105. [[CrossRef](#)]
16. Castillo-Olivares, J.; Wood, J. West Nile virus infection of horses. *Vet. Res.* **2004**, *35*, 467–483. [[CrossRef](#)]
17. Murgue, B.; Murri, S.; Triki, H.; Deubel, V.; Zeller, H.G. West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *951*, 117–126. [[CrossRef](#)]
18. Tsai, T.F.; Popovici, F.; Cernescu, C.; Campbell, G.L.; Nedelcu, N.I. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **1998**, *352*, 767–771. [[CrossRef](#)]
19. Weinberger, M.; Pitlik, S.D.; Gandacu, D.; Lang, R.; Nassar, F.; Ben David, D.; Rubinstein, E.; Izthaki, A.; Mishal, J.; Kitzes, R.; et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: Epidemiologic aspects. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 686–691. [[CrossRef](#)]
20. Bondre, V.P.; Jadhav, R.S.; Mishra, A.C.; Yergolkar, P.N.; Arankalle, V.A. West Nile virus isolates from India: Evidence for a distinct genetic lineage. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 875–884. [[CrossRef](#)]
21. Danis, K.; Papa, A.; Theocharopoulos, G.; Dougas, G.; Athanasiou, M.; Detsis, M.; Baka, A.; Lytras, T.; Mellou, K.; Bonovas, S.; et al. Outbreak of West Nile Virus Infection in Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1868–1872. [[CrossRef](#)]
22. Venter, M.; Pretorius, M.; Fuller, J.A.; Botha, E.; Rakgotho, M.; Stivaktas, V.; Weyer, C.; Romito, M.; Williams, J. West Nile Virus Lineage 2 in Horses and Other Animals with Neurologic Disease, South Africa, 2008–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2060–2064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bakonyi, T.; Ivanics, E.; Erdélyi, K.; Ursu, K.; Ferenczi, E.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 618–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. de Heus, P.; Kolodziejek, J.; Camp, J.V.; Dimmel, K.; Bagó, Z.; Hubálek, Z.; van den Hoven, R.; Cavalleri, J.M.V.; Nowotny, N. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1189–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bakonyi, T.; Ferenczi, E.; Erdelyi, K.; Kutasi, O.; Csorgo, T.; Seidel, B.; Weissenböck, H.; Brugger, K.; Ban, E.; Nowotny, N. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 61–70. [[CrossRef](#)]

26. Savini, G.; Capelli, G.; Monaco, F.; Polci, A.; Russo, F.; Di Gennaro, A.; Marini, V.; Teodori, L.; Montarsi, F.; Pinoni, C.; et al. Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* **2012**, *158*, 267–273. [[CrossRef](#)]
27. Papa, A.; Danis, K.; Baka, A.; Bakas, A.; Dougas, G.; Lytras, T.; Theocharopoulos, G.; Chrysagis, D.; Vassiliadou, E.; Kamaria, F.; et al. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro Surveill.* **2010**, *15*, 19644. [[CrossRef](#)]
28. Napp, S.; Petrić, D.; Busquets, N. West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathog. Glob. Health* **2018**, *112*, 233–248. [[CrossRef](#)]
29. Busquets, N.; Laranjo-González, M.; Soler, M.; Nicolás, O.; Rivas, R.; Talavera, S.; Villalba, R.; San Miguel, E.; Torner, N.; Aranda, C.; et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 617–621. [[CrossRef](#)]
30. Michel, F.; Sieg, M.; Fischer, D.; Keller, M.; Eiden, M.; Reuschel, M.; Schmidt, V.; Schwehn, R.; Rinder, M.; Urbaniak, S.; et al. Evidence for West Nile Virus and Usutu Virus Infections in Wild and Resident Birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses* **2019**, *11*, 674. [[CrossRef](#)]
31. Ziegler, U.; Lühken, R.; Keller, M.; Cadar, D.; van der Grinten, E.; Michel, F.; Albrecht, K.; Eiden, M.; Rinder, M.; Lachmann, L.; et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antivir. Res.* **2019**, *162*, 39–43. [[CrossRef](#)]
32. Platonov, A.E.; Karan, L.S.; Shopenskaia, T.A.; Fedorova, M.V.; Koliashnikova, N.M.; Rusakova, N.M.; Shishkina, L.V.; Arshba, T.E.; Zhuravlev, V.I.; Govorukhina, M.V.; et al. [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: Principles and results]. *Zhurnal Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **2011**, *2*, 29–37.
33. Papa, A.; Papadopoulou, E.; Chatzixanthoulou, C.; Glouftsios, P.; Pappa, S.; Pervanidou, D.; Georgiou, L. Emergence of West Nile virus lineage 2 belonging to the Eastern European subclade, Greece. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1673–1675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cotar, A.I.; Fălcută, E.; Dinu, S.; Necula, A.; Birluțiu, V.; Ceianu, C.S.; Prioteasa, F.L. West Nile virus lineage 2 in Romania, 2015–2016: Co-circulation and strain replacement. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Venter, M.; Swanepoel, R. West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 659–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Glass, W.G.; Lim, J.K.; Cholera, R.; Pletnev, A.G.; Gao, J.L.; Murphy, P.M. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 1087–1098. [[CrossRef](#)]
37. Durrant, D.M.; Daniels, B.P.; Pasiaka, T.; Dorsey, D.; Klein, R.S. CCR5 limits cortical viral loads during West Nile virus infection of the central nervous system. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 233. [[CrossRef](#)]
38. Chong, H.Y.; Leow, C.Y.; Abdul Majeed, A.B.; Leow, C.H. Flavivirus infection—A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Res.* **2019**, *274*, 197770. [[CrossRef](#)]
39. Donadieu, E.; Bahuon, C.; Lowenski, S.; Zientara, S.; Couplier, M.; Lecollinet, S. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. *Viruses* **2013**, *5*, 2856–2880. [[CrossRef](#)]
40. Samuel, M.A.; Diamond, M.S. Pathogenesis of West Nile Virus infection: A balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9349–9360. [[CrossRef](#)]
41. Donadieu, E.; Lowenski, S.; Servely, J.L.; Laloy, E.; Lilin, T.; Nowotny, N.; Richardson, J.; Zientara, S.; Lecollinet, S.; Couplier, M. Comparison of the neuropathology induced by two West Nile virus strains. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84473. [[CrossRef](#)]
42. Graham, J.B.; Thomas, S.; Swarts, J.; McMillan, A.A.; Ferris, M.T.; Suthar, M.S.; Treuting, P.M.; Ireton, R.; Gale, M., Jr.; Lund, J.M. Genetic diversity in the collaborative cross model recapitulates human West Nile virus disease outcomes. *mBio* **2015**, *6*, e00493–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ramanathan, M.P.; Chambers, J.A.; Pankhong, P.; Chattergoon, M.; Attatippaholkun, W.; Dang, K.; Shah, N.; Weiner, D.B. Host cell killing by the West Nile Virus NS2B-NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. *Virology* **2006**, *345*, 56–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. van Marle, G.; Antony, J.; Ostermann, H.; Dunham, C.; Hunt, T.; Halliday, W.; Maingat, F.; Urbanowski, M.D.; Hobman, T.; Peeling, J.; et al. West Nile virus-induced neuroinflammation: Glial infection and capsid protein-mediated neurovirulence. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10933–10949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Sevjar, J.J.; Haddad, M.B.; Tierney, B.C.; Campbel, G.L. Neurologic manifestations and outcome of West Nile Virus Infection. *JAMA* **2003**, *290*, 511–515.
46. Fischer, S.A. Emerging viruses in transplantation: There is more to infection after transplant than CMV and EBV. *Transplantation* **2008**, *86*, 1327–1339. [[CrossRef](#)]
47. Hubálek, Z.; Halouzka, J. West Nile Fever—A Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 643–650. [[CrossRef](#)]
48. Komar, N.; Langevin, S.; Hinten, S. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 311–322. [[CrossRef](#)]
49. Pérez-Ramírez, E.; Llorente, F.; Jiménez-Clavero, M.Á. Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus. *Viruses* **2014**, *6*, 752–781. [[CrossRef](#)]
50. Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Petrovic, T.; Toplak, I.; Barbic, L.; Petric, D.; Tabain, I.; Hrnjakovic-Cvjetkovic, I.; Bogdanic, M.; Klobucar, A.; et al. Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 437. [[CrossRef](#)]
51. Guzman, M.G.; Gubler, D.J.; Izquierdo, A. Dengue infection. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2016**, *2*, 16055. [[CrossRef](#)]
52. Akner, M.M.; Ozturk, M.; Başer, A.B. Arboviral screening of invasive Aedes species in northeastern Turkey: West Nile virus circulation and detection of insect-only viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Mancini, G.; Montarsi, F.; Calzolari, M.; Capelli, G.; Dottori, M.; Ravagnan, S.; Lelli, D.; Chiari, M.; Santilli, A.; Quaglia, M.; et al. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Vet. Ital.* **2017**, *53*, 97–110. [[CrossRef](#)]
54. Brustolin, M.; Talavera, S.; Santamaría, C. Culex pipiens and Stegomyia albopicta (=Aedes albopictus) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2016**, *30*, 166–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Turell, M.J.; O’Guinn, M.L.; Dohm, D.J. Vector Competence of North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. *J. Med. Entomol.* **2001**, *38*, 130–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Peiris, J.S.; Amerasinghe, P.H.; Amerasinghe, F.P.; Calisher, C.H.; Perera, L.P.; Arunagiri, C.K.; Munasingha, N.B.; Karunaratne, S.H. Viruses isolated from mosquitoes collected in Sri Lanka. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1994**, *51*, 154–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Hurlbut, H.S.; Rizk, F.; Taylor, R.M.; Work, T.H. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1956**, *5*, 579–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Doherty, R.L.; Carley, J.G.; Mackerras, M.J.; Marks, E.N. Studies of arthropod-borne virus infections in Queensland. III. Isolation and characterization of virus strains from wild-caught mosquitoes in North Queensland. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **1963**, *41*, 17–39. [[CrossRef](#)]
59. Jansen, C.C.; Ritchie, S.A.; van den Hurk, A.F. The role of Australian mosquito species in the transmission of endemic and exotic West Nile virus strains. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3735–3752. [[CrossRef](#)]
60. Garcia, M.; Alout, H.; Diop, F.; Damour, A.; Bengue, M.; Weill, M.; Missé, D.; Lévêque, N.; Bodet, C. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 387. [[CrossRef](#)]
61. Arjona, A.; Foellmer, H.G.; Town, T.; Leng, L.; McDonald, C.; Wang, T.; Wong, S.J.; Montgomery, R.R.; Fikrig, E.; Bucala, R. Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 3059–3066. [[CrossRef](#)]
62. Pakozdi, A.; Amin, M.A.; Haas, C.S.; Martinez, R.J.; Haines, G.K.; Santos, L.L.; Morand, E.F.; David, J.R.; Koch, A.E. Macrophage migration inhibitory factor: A mediator of matrix metalloproteinase-2 production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2006**, *8*, R132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Yu, X.; Lin, S.-G.; Huang, X.R.; Bacher, M.; Leng, L.; Bucala, R.; Lan, H.Y. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway. *J. Interferon Cytokine Res.* **2007**, *27*, 103–109. [[CrossRef](#)]
64. Gasche, Y.; Soccia, P.M.; Kanemitsu, M.; Copin, J.-C. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 1289–1301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Klein, R.S.; Diamond, M.S. Immunological headgear: Antiviral immune responses protect against neuroinvasive West Nile virus. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 286–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

66. Wang, P.; Dai, J.; Bai, F.; Kong, K.F.; Wong, S.J.; Montgomery, R.R.; Madri, J.A.; Fikrig, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8978–8985. [[CrossRef](#)]
67. Mustafá, Y.M.; Meuren, L.M.; Coelho, S.V.A.; de Arruda, L.B. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 525. [[CrossRef](#)]
68. Vogels, C.B.; Goertz, G.P.; Pijlman, G.P.; Koenraadt, C.J. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e96. [[CrossRef](#)]
69. Monteiro, V.V.S.; Navegantes-Lima, K.C.; de Lemos, A.B.; da Silva, G.L.; de Souza Gomes, R.; Reis, J.F.; Rodrigues Junior, L.C.; da Silva, O.S.; Romão, P.R.T.; Monteiro, M.C. Aedes-Chikungunya Virus Interaction: Key Role of Vector Midguts Microbiota and Its Saliva in the Host Infection. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 492. [[CrossRef](#)]
70. Samuel, M.A.; Wang, H.; Siddharthan, V.; Morrey, J.D.; Diamond, M.S. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17140–17145. [[CrossRef](#)]
71. Brault, A.C.; Langevin, S.A.; Ramey, W.N.; Fang, Y.; Beasley, D.W.; Barker, C.M.; Sanders, T.A.; Reisen, W.K.; Barrett, A.D.; Bowen, R.A. Reduced avian virulence and viremia of West Nile virus isolates from Mexico and Texas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 758–767. [[CrossRef](#)]
72. Jerzak, G.; Bernard, K.A.; Kramer, L.D.; Ebel, G.D. Genetic variation in West Nile virus from naturally infected mosquitoes and birds suggests quasispecies structure and strong purifying selection. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 2175–2183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dridi, M.; Rosseel, T.; Orton, R.; Johnson, P.; Lecollinet, S.; Muylkens, B.; Lambrecht, B.; Van Borm, S. Next-generation sequencing shows West Nile virus quasispecies diversification after a single passage in a carrion crow (*Corvus corone*) in vivo infection model. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2999–3009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Jerzak, G.V.; Bernard, K.; Kramer, L.D.; Shi, P.Y.; Ebel, G.D. The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology* **2007**, *360*, 469–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Vignuzzi, M.; Stone, J.K.; Arnold, J.J.; Cameron, C.E.; Andino, R. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions within a viral population. *Nature* **2006**, *439*, 344–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Murata, R.; Eshita, Y.; Maeda, A. Glycosylation of the West Nile Virus Envelope Protein Increases In Vivo and In Vitro Viral Multiplication in Birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 696–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Baltimore, D. Viral genetic systems. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **1971**, *33*, 327–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, *51 Pt 1*, 263–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Aubry, F.; Nougairede, A.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antivir. Res.* **2015**, *114*, 67–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Gritsun, T.S.; Gould, E.A. Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology* **1995**, *214*, 611–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Edmonds, J.; van Grinsven, E.; Prow, N.; Bosco-Lauth, A.; Brault, A.C.; Bowen, R.A.; Hall, R.A.; Khromykh, A.A. A Novel Bacterium-Free Method for Generation of Flavivirus Infectious DNA by Circular Polymerase Extension Reaction Allows Accurate Recapitulation of Viral Heterogeneity. *J. Virol.* **2013**, *87*, 2367–2372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Siridechadilok, B.; Gomutsukhavadee, M.; Sawaengpol, T.; Sangiambut, S.; Puttikhunt, C.; Chin-inmanu, K.; Suriyaphol, P.; Malasit, P.; Sreaton, G.; Mongkolsapaya, J. A simplified positive-sense-RNA virus construction approach that enhances analysis throughput. *J. Virol.* **2013**, *87*, 12667–12674. [[CrossRef](#)]
83. Aubry, F.; Nougairede, A.; de Fabritus, L.; Querat, G.; Gould, E.A.; de Lamballerie, X. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 2462–2467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Driouich, J.S.; Moureau, G.; de Lamballerie, X.; Nougairede, A. Reverse Genetics of RNA Viruses: ISA-Based Approach to Control Viral Population Diversity without Modifying Virus Phenotype. *Viruses* **2019**, *11*, 666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Samuel, M.A.; Whitby, K.; Keller, B.C. PKR and RNase L Contribute to Protection against Lethal West Nile Virus Infection by Controlling Early Viral Spread in the Periphery and Replication in Neurons. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7009–7019. [[CrossRef](#)]
86. Suthar, M.S.; Ma, D.Y.; Thomas, S.; Lund, J.M.; Zhang, N.; Daffis, S.; Rudensky, A.Y.; Bevan, M.J.; Clark, E.A.; Kaja, M.-K.; et al. IPS-1 Is Essential for the Control of West Nile Virus Infection and Immunity. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Graham, J.B.; Swarts, J.L.; Lund, J.M. A Mouse Model of West Nile Virus Infection. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2017**, *7*, 221–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Kaiser, J.A.; Wang, T.; Barrett, A.D. Virulence determinants of West Nile virus: How can these be used for vaccine design? *Future Virol.* **2017**, *12*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Zhang, B.; Dong, H.; Stein, D.A.; Iversen, P.L.; Shi, P.-Y. West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions. *Virology* **2008**, *373*, 1–13. [[CrossRef](#)]
90. Sirigulpanit, W.; Kinney, R.M.; Leardkamolkarn, V. Substitution or deletion mutations between nt 54 and 70 in the 5' non-coding region of dengue type 2 virus produce variable effects on virus viability. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1748–1752. [[CrossRef](#)]
91. Audsley, M.; Edmonds, J.; Liu, W.; Mokhonov, V.; Mokhonova, E.; Melian, E.B.; Prow, N.; Hall, R.A.; Khromykh, A.A. Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile virus. *Virology* **2011**, *414*, 63–73. [[CrossRef](#)]
92. Hanna, S.L.; Pierson, T.C.; Sanchez, M.D. N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13262–13274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Nowak, T.; Färber, P.M.; Wengler, G.; Wengler, G. Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* **1989**, *169*, 365–376. [[CrossRef](#)]
94. Guirakhoo, F.; Bolin, R.A.; Roehrig, J.T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* **1992**, *191*, 921–931. [[CrossRef](#)]
95. Heinz, F.X.; Stiasny, K.; Püschner-Auer, G.; Holzmann, H.; Allison, S.L.; Mandl, C.W.; Kunz, C. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* **1994**, *198*, 109–117. [[CrossRef](#)]
96. de Wispelaere, M.; Frenkiel, M.P.; Desprès, P. A Japanese encephalitis virus genotype 5 molecular clone is highly neuropathogenic in a mouse model: Impact of the structural protein region on virulence. *J. Virol.* **2015**, *89*, 5862–5875. [[CrossRef](#)]
97. Basset, J.; Burlaud-Gaillard, J.; Feher, M.; Roingeard, P.; Rey, F.A.; Pardigon, N. A Molecular Determinant of West Nile Virus Secretion and Morphology as a Target for Viral Attenuation. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00086-20. [[CrossRef](#)]
98. Brabant, M.; Baux, L.; Casimir, R.; Briand, J.P.; Chaloin, O.; Porceddu, M.; Buron, N.; Chauvier, D.; Lassalle, M.; Lecoeur, H.; et al. A flavivirus protein M-derived peptide directly permeabilizes mitochondrial membranes, triggers cell death and reduces human tumor growth in nude mice. *Apoptosis* **2009**, *14*, 1190–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Catteau, A.; Kalinina, O.; Wagner, M.-C.; Deubel, V.; Courageot, M.-P.; Desprès, P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2781–2793. [[CrossRef](#)]
100. Rizzo, S.; Imperato, P.; Mora-Cárdenas, E.; Konstantinidou, S.; Marcello, A.; Sblattero, D. Selection and characterization of highly specific recombinant antibodies against West Nile Virus E protein. *J. Biotechnol.* **2020**, *311*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Knipe, D.M.; Howley, P. *Fields Virology*, 6th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013.
102. Beasley, D.W.C.; Whiteman, M.C.; Zhang, S.; Huang, C.Y.H.; Schneider, B.S.; Smith, D.R.; Gromowski, G.D.; Higgs, S.; Kinney, R.M.; Barrett, A.D.T. Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8339–8347. [[CrossRef](#)]
103. Nybakken, G.E.; Nelson, C.A.; Chen, B.R.; Diamond, M.S.; Fremont, D.H. Crystal Structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11467–11474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

104. Adams, S.C.; Broom, A.K.; Sammels, L.M.; Hartnett, A.C.; Howard, M.J.; Coelen, R.J.; Mackenzie, J.S.; Hall, R.A. Glycosylation and antigenic variation among Kunjin virus isolates. *Virology* **1995**, *206*, 49–56. [[CrossRef](#)]
105. Berthet, F.X.; Zeller, H.G.; Drouet, M.T.; Rauzier, J.; Digoutte, J.P.; Deubel, V. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.* **1997**, *78 Pt 9*, 2293–2297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Chambers, T.J.; Halevy, M.; Nestorowicz, A.; Rice, C.M.; Lustig, S. West Nile virus envelope proteins: Nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J. Gen. Virol.* **1998**, *79 Pt 10*, 2375–2380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Shirato, K.; Miyoshi, H.; Goto, A.; Ako, Y.; Ueki, T.; Kariwa, H.; Takashima, I. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3637–3645. [[CrossRef](#)]
108. Alsaleh, K.; Khou, C.; Frenkiel, M.P.; Lecollinet, S.; Vazquez, A.; de Arellano, E.R.; Despres, P.; Pardigon, N. The E glycoprotein plays an essential role in the high pathogenicity of European-Mediterranean IS98 strain of West Nile virus. *Virology* **2016**, *492*, 53–65. [[CrossRef](#)]
109. Davis, C.T.; Ebel, G.D.; Lanciotti, R.S.; Brault, A.C.; Guzman, H.; Siirin, M.; Lambert, A.; Parsons, R.E.; Beasley, D.W.C.; Novak, R.J.; et al. Phylogenetic analysis of North American West Nile virus isolates, 2001–2004: Evidence for the emergence of a dominant genotype. *Virology* **2005**, *342*, 252–265. [[CrossRef](#)]
110. Moudy, R.M.; Meola, M.A.; Morin, L.-L. A Newly Emergent Genotype of West Nile Virus Is Transmitted Earlier and More Efficiently by Culex Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 365–370. [[CrossRef](#)]
111. Kobayashi, S.; Kaneko, C.; Kawakami, R.; Hasebe, R.; Sawa, H.; Yoshii, K.; Kariwa, H. Amino acid 159 of the envelope protein affects viral replication and T-cell infiltration by West Nile virus in intracranial infection. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 7168. [[CrossRef](#)]
112. Zhang, S.; Li, L.; Woodson, S.E.; Huang, C.Y.H.; Kinney, R.M.; Barrett, A.D.T.; Beasley, D.W.C. A mutation in the envelope protein fusion loop attenuates mouse neuroinvasiveness of the NY99 strain of West Nile virus. *Virology* **2006**, *353*, 35–40. [[CrossRef](#)]
113. Kaiser, J.A.; Luo, H.; Widen, S.G.; Wood, T.G.; Huang, C.Y.; Wang, T.; Barrett, A.D.T. Japanese encephalitis vaccine-specific envelope protein E138K mutation does not attenuate virulence of West Nile virus. *NPJ Vaccines* **2019**, *4*, 50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Winkler, G.; Randolph, V.B.; Cleaves, G.R.; Ryan, T.E.; Stollar, V. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* **1988**, *162*, 187–196. [[CrossRef](#)]
115. Chung, K.M.; Liszewski, M.K.; Nybakken, G.; Davis, A.E.; Townsend, R.R.; Fremont, D.H.; Atkinson, J.P.; Diamond, M.S. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19111–19116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Whiteman, M.C.; Li, L.; Wicker, J.A.; Kinney, R.M.; Huang, C.; Beasley, D.W.C.; Chung, K.M.; Diamond, M.S.; Solomon, T.; Barrett, A.D.T. Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine* **2010**, *28*, 1075–1083. [[CrossRef](#)]
117. Muller, D.A.; Young, P.R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir. Res.* **2013**, *98*, 192–208. [[CrossRef](#)]
118. Petersen, L.R.; Roehrig, J.T. West Nile virus: A reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 611–614. [[CrossRef](#)]
119. Szentpali-Gavaller, K.; Lim, S.M.; Dencso, L.; Banyai, K.; Koraka, P.; Osterhaus, A.D.; Martina, B.E.; Bakonyi, T.; Balint, A. In Vitro and in Vivo Evaluation of Mutations in the NS Region of Lineage 2 West Nile Virus Associated with Neuroinvasiveness in a Mammalian Model. *Viruses* **2016**, *8*, 49. [[CrossRef](#)]
120. Hall, R.A.; Khromykh, A.A.; Mackenzie, J.M.; Scherret, J.H.; Khromykh, T.I.; Mackenzie, J.S. Loss of dimerisation of the nonstructural protein NS1 of Kunjin virus delays viral replication and reduces virulence in mice, but still allows secretion of NS1. *Virology* **1999**, *264*, 66–75. [[CrossRef](#)]
121. Mackenzie, J.M.; Khromykh, A.A.; Jones, M.K.; Westaway, E.G. Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* **1998**, *245*, 203–215. [[CrossRef](#)]
122. Liu, W.J.; Chen, H.B.; Wang, X.J.; Huang, H.; Khromykh, A.A. Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12225–12235. [[CrossRef](#)]

123. Liu, W.J.; Wang, X.J.; Mokhonov, V.V.; Shi, P.-Y.; Randall, R.; Khromykh, A.A. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *J. Virol.* **2005**, *79*, 1934–1942. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Liu, W.J.; Wang, X.J.; Clark, D.C.; Lobigs, M.; Hall, R.A.; Khromykh, A.A. A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice. *J. Virol.* **2006**, *80*, 2396–2404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Arias, C.F.; Preugschat, F.; Strauss, J.H. Dengue 2 Virus NS2B and NS3 Form a Stable Complex That Can Cleave NS3 within the Helicase Domain. *Virology* **1993**, *193*, 888–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Chambers, T.J.; Nestorowicz, A.; Amberg, S.M.; Rice, C.M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: Effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.* **1993**, *67*, 6797–6807. [[CrossRef](#)]
127. Jan, L.R.; Yang, C.S.; Trent, D.W.; Falgout, B.; Lai, C.J. Processing of Japanese encephalitis virus non-structural proteins: NS2B-NS3 complex and heterologous proteases. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76 Pt 3*, 573–580. [[CrossRef](#)]
128. Rossi, S.L.; Fayzulin, R.; Dewsbury, N.; Bourne, N.; Mason, P.W. Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. *Virology* **2007**, *364*, 184–195. [[CrossRef](#)]
129. Zhou, H.; Singh, N.J.; Kim, K.S. Homology modeling and molecular dynamics study of West Nile virus NS3 protease: A molecular basis for the catalytic activity increased by the NS2B cofactor. *Proteins* **2006**, *65*, 692–701. [[CrossRef](#)]
130. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E.A.; et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antivir. Res.* **2010**, *87*, 125–148. [[CrossRef](#)]
131. Ebel, G.D.; Fitzpatrick, K.A.; Lim, P.Y.; Bennett, C.J.; Deardorff, E.R.; Jerzak, G.V.; Kramer, L.D.; Zhou, Y.; Shi, P.Y.; Bernard, K.A. Nonconsensus West Nile virus genomes arising during mosquito infection suppress pathogenesis and modulate virus fitness in vivo. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12605–12613. [[CrossRef](#)]
132. Wu, J.; Bera, A.K.; Kuhn, R.J.; Smith, J.L. Structure of the Flavivirus helicase: Implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J. Virol.* **2005**, *79*, 10268–10277. [[CrossRef](#)]
133. Brault, A.C.; Langevin, S.A.; Bowen, R.A.; Panella, N.A.; Biggerstaff, B.J.; Miller, B.R.; Komar, N. Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 2161–2168. [[CrossRef](#)]
134. Langevin, S.A.; Bowen, R.A.; Reisen, W.K. Host Competence and Helicase Activity Differences Exhibited by West Nile Viral Variants Expressing NS3-249 Amino Acid Polymorphisms. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Sotelo, E.; Fernandez-Pinero, J.; Llorente, F.; Agüero, M.; Hoefle, U.; Blanco, J.M.; Jiménez-Clavero, M.A. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: New insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* **2009**, *395*, 289–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Shiryaev, S.A.; Chernov, A.V.; Aleshin, A.E.; Shiryaeva, T.N.; Strongin, A.Y. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2081–2085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Ambrose, R.L.; Mackenzie, J.M. A Conserved Peptide in West Nile Virus NS4A Protein Contributes to Proteolytic Processing and Is Essential for Replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11274–11282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Evans, J.D.; Seeger, C. Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J. Virol.* **2007**, *81*, 11809–11816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Wicker, J.A.; Whiteman, M.C.; Beasley, D.W.C.; Davis, C.T.; McGee, C.E.; Lee, J.C.; Higgs, S.; Kinney, R.M.; Huang, C.Y.H.; Barrett, A.D.T. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology* **2012**, *426*, 22–33. [[CrossRef](#)]
140. Zhang, L.; Mohan, P.M.; Padmanabhan, R. Processing and localization of Dengue virus type 2 polyprotein precursor NS3-NS4A-NS4B-NS5. *J. Virol.* **1992**, *66*, 7549–7554. [[CrossRef](#)]
141. Hanley, K.A.; Manlucu, L.R.; Gilmore, L.E.; Blaney, J.E.; Hanson, C.T.; Murphy, B.R.; Whitehead, S.S. A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4. *Virology* **2003**, *312*, 222–232. [[CrossRef](#)]
142. Pletnev, A.G.; Putnak, R.; Speicher, J.; Wagar, E.J.; Vaughn, D.W. West Nile virus/dengue type 4 virus chimeras that are reduced in neurovirulence and peripheral virulence without loss of immunogenicity or protective efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3036–3041. [[CrossRef](#)]

143. Blaney, J.E.; Manipon, G.G.; Firestone, C.Y.; Johnson, D.H.; Hanson, C.T.; Murphy, B.R.; Whitehead, S.S. Mutations which enhance the replication of dengue virus type 4 and an antigenic chimeric dengue virus type 2/4 vaccine candidate in Vero cells. *Vaccine* **2003**, *21*, 4317–4327. [[CrossRef](#)]
144. Wicker, J.A.; Whiteman, M.C.; Beasley, D.W.C.; Davis, C.T.; Zhang, S.; Schneider, B.S.; Higgs, S.; Kinney, R.M.; Barrett, A.D.T. A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology* **2006**, *349*, 245–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Puig-Basagoiti, F.; Tilgner, M.; Bennett, C.J.; Zhou, Y.; Muñoz-Jordán, J.L.; García-Sastre, A.; Bernard, K.A.; Shi, P.-Y. A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* **2007**, *361*, 229–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Davis, C.T.; Beasley, D.W.C.; Guzman, H.; Siirin, M.; Parsons, R.E.; Tesh, R.B.; Barrett, A.D.T. Emergence of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology* **2004**, *330*, 342–350. [[CrossRef](#)]
147. Klema, V.J.; Ye, M.; Hindupur, A.; Teramoto, T.; Gottipati, K.; Padmanabhan, R.; Choi, K.H. Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Guo, Y.; Bernard, K.A.; Shi, P.-Y.; Li, H. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3891–3903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Davis, C.T.; Galbraith, S.E.; Zhang, S.; Whiteman, M.C.; Li, L.; Kinney, R.M.; Barrett, A.D.T. A Combination of Naturally Occurring Mutations in North American West Nile Virus Nonstructural Protein Genes and in the 3' Untranslated Region Alters Virus Phenotype. *J. Virol.* **2007**, *81*, 6111–6116. [[CrossRef](#)]
150. Daffis, S.; Lazear, H.M.; Liu, W.J.; Audsley, M.; Engle, M.; Khromykh, A.A.; Diamond, M.S. The naturally attenuated Kunjin strain of West Nile virus shows enhanced sensitivity to the host type I interferon response. *J. Virol.* **2011**, *85*, 5664–5668. [[CrossRef](#)]
151. Li, X.-F.; Zhao, W.; Lin, F.; Ye, Q.; Wang, H.-J.; Yang, D.; Li, S.-H.; Zhao, H.; Xu, Y.-P.; Ma, J.; et al. Development of chimeric West Nile virus attenuated vaccine candidate based on the Japanese encephalitis vaccine strain SA14-14-2. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 2700–2709. [[CrossRef](#)]
152. Züst, R.; Dong, H.; Li, X.-F.; Chang, D.C.; Zhang, B.; Balakrishnan, T.; Toh, Y.-X.; Jiang, T.; Li, S.-H.; Deng, Y.-Q.; et al. Rational Design of a Live Attenuated Dengue Vaccine: 2'-O-Methyltransferase Mutants Are Highly Attenuated and Immunogenic in Mice and Macaques. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003521. [[CrossRef](#)]
153. Züst, R.; Li, S.-H.; Xie, X.; Velumani, S.; Chng, M.; Toh, Y.-X.; Zou, J.; Dong, H.; Shan, C.; Pang, J.; et al. Characterization of a candidate tetravalent vaccine based on 2'-O-methyltransferase mutants. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0189262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Kaiser, J.A.; Luo, H.; Widen, S.G.; Wood, T.G.; Huang, C.Y.; Wang, T.; Barrett, A.D.T. Genotypic and phenotypic characterization of West Nile virus NS5 methyltransferase mutants. *Vaccine* **2019**, *37*, 7155–7164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Thurner, C.; Witwer, C.; Hofacker, I.L.; Stadler, P.F. Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Roby, J.A.; Hall, R.A.; Khromykh, A.A. West Nile Virus Genome with Glycosylated Envelope Protein and Deletion of Alpha Helices 1, 2, and 4 in the Capsid Protein Is Noninfectious and Efficiently Secretes Subviral Particles. *J. Virol.* **2013**, *87*, 13063–13069. [[CrossRef](#)]
157. Lin, K.-C.; Chang, H.-L.; Chang, R.-Y. Accumulation of a 3'-Terminal Genome Fragment in Japanese Encephalitis Virus-Infected Mammalian and Mosquito Cells. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5133–5138. [[CrossRef](#)]
158. Pijlman, G.P.; Funk, A.; Kondratieva, N.; Leung, J.; Torres, S.; van der Aa, L.; Liu, W.J.; Palmenberg, A.C.; Shi, P.-Y.; Hall, R.A.; et al. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 579–591. [[CrossRef](#)]
159. Silva, P.A.G.C.; Pereira, C.F.; Dalebout, T.J.; Spaan, W.J.M.; Bredenbeek, P.J. An RNA pseudoknot is required for production of yellow fever virus subgenomic RNA by the host nuclease XRN1. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11395–11406. [[CrossRef](#)]
160. Funk, A.; Truong, K.; Nagasaki, T.; Torres, S.; Floden, N.; Balmori Melian, E.; Edmonds, J.; Dong, H.; Shi, P.-Y.; Khromykh, A.A. RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA. *J. Virol.* **2010**, *84*, 11407–11417. [[CrossRef](#)]
161. Dridi, M.; Rauw, F.; Muylkens, B.; Lecollinet, S.; van den Berg, T.; Lambrecht, B. Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60* (Suppl. 2), 51–62. [[CrossRef](#)]

162. Langevin, S.A.; Bowen, R.A.; Ramey, W.N. Envelope and pre-membrane protein structural amino acid mutations mediate diminished avian growth and virulence of a Mexican West Nile virus isolate. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2810–2820. [[CrossRef](#)]
163. Totani, M.; Yoshii, K.; Kariwa, H. Glycosylation of the Envelope Protein of West Nile Virus Affects Its Replication in Chicks. *Avian Dis.* **2011**, *55*, 561–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Estrada-Franco, J.G.; Navarro-Lopez, R.; Beasley, D.W.C.; Coffey, L.; Carrara, A.-S.; Travassos da Rosa, A.; Clements, T.; Wang, E.; Ludwig, G.V.; Cortes, A.C.; et al. West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 1604–1607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Morales-Betoulle, M.E.; Morales, H.; Blitvich, B.J.; Powers, A.M.; Davis, E.A.; Klein, R.; Cerdón-Rosales, C. West Nile virus in horses, Guatemala. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1038–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Bosch, I.; Herrera, F.; Navarro, J.-C.; Lentino, M.; Dupuis, A.; Maffei, J.; Jones, M.; Fernández, E.; Perez, N.; Pérez-Emán, J.; et al. West Nile Virus, Venezuela. *Emerg. Infect. Dis.* **2007**, *13*, 651–653. [[CrossRef](#)]
167. Andrade, C.C.; Maharaj, P.D.; Reisen, W.K.; Brault, A.C. North American West Nile virus genotype isolates demonstrate differential replicative capacities in response to temperature. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2523–2533. [[CrossRef](#)]
168. Kinney, R.M.; Huang, C.Y.H.; Whiteman, M.C. Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 3611–3622. [[CrossRef](#)]
169. Dietrich, E.; Langevin, S.; Huang, C.H.; Maharaj, P.; Delorey, M.J.; Bowen, R.; Kinney, R.; Brault, A. West Nile Virus Temperature Sensitivity and Avian Virulence Are Modulated by NS1-2B Polymorphisms. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004938. [[CrossRef](#)]
170. Reisen, W.K.; Fang, Y.; Martinez, V.M. Effects of temperature on the transmission of west nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 309–317. [[CrossRef](#)]
171. Anderson, S.L.; Richards, S.L.; Tabachnick, W.J.; Smartt, C.T. Effects of west nile virus dose and extrinsic incubation temperature on temporal progression of vector competence in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2010**, *26*, 103–107. [[CrossRef](#)]
172. Kilpatrick, A.M.; Meola, M.A.; Moudy, R.M.; Kramer, L.D. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* **2008**, *4*, e1000092. [[CrossRef](#)]
173. Brault, A.C.; Huang, C.Y.H.; Langevin, S.A.; Kinney, R.M.; Bowen, R.A.; Ramey, W.N.; Panella, N.A.; Holmes, E.C.; Powers, A.M.; Miller, B.R. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1162–1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Liu, Y.; Cheng, G. Techniques for Experimental Infection of Mosquitoes with West Nile Virus. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1435*, 151–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Moudy, R.M.; Zhang, B.; Shi, P.-Y. West Nile virus envelope protein glycosylation is required for efficient viral transmission by *Culex* vectors. *Virology* **2009**, *387*, 222–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Li, J.; Bhuvanathan, R.; Howe, J. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafen) plays an important role in replication and maturation processes. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 613–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Van Slyke, G.A.; Jia, Y.; Whiteman, M.C.; Wicker, J.A.; Barrett, A.D.T.; Kramer, L.D. Vertebrate attenuated West Nile virus mutants have differing effects on vector competence in *Culex tarsalis* mosquitoes. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 1069–1072. [[CrossRef](#)]
178. Reisen, W.K. Ecology of West Nile Virus in North America. *Viruses* **2013**, *5*, 2079–2105. [[CrossRef](#)]
179. Mann, B.R.; McMullen, A.R.; Swetnam, D.M.; Barrett, A.D.T. Molecular Epidemiology and Evolution of West Nile Virus in North America. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 5111–5129. [[CrossRef](#)]
180. Pletnev, A.G.; Bray, M.; Lai, C.J. Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: Effects of mutations on neurovirulence in mice. *J. Virol.* **1993**, *67*, 4956–4963. [[CrossRef](#)]
181. McElroy, K.L.; Girard, Y.A.; McGee, C.E.; Tsatsarkin, K.A.; Vanlandingham, D.L.; Higgs, S. Characterization of the antigen distribution and tissue tropisms of three phenotypically distinct yellow fever virus variants in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 675–687. [[CrossRef](#)]
182. Yoshii, K.; Sunden, Y.; Yokozawa, K.; Igarashi, M.; Kariwa, H.; Holbrook, M.R.; Takashima, I. A critical determinant of neurological disease associated with highly pathogenic tick-borne flavivirus in mice. *J. Virol.* **2014**, *88*, 5406–5420. [[CrossRef](#)]

183. Mossenta, M.; Marchese, S.; Poggianella, M.; Slon Campos, J.L.; Burrone, O.R. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *492*, 579–586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Annamalai, A.S.; Pattnaik, A.; Sahoo, B.R.; Muthukrishnan, E.; Natarajan, S.K.; Steffen, D.; Vu, H.L.X.; Delhon, G.; Osorio, F.A.; Petro, T.M.; et al. Zika Virus Encoding Nonglycosylated Envelope Protein Is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01348-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Butrapet, S.; Childers, T.; Moss, K.J.; Erb, S.M.; Luy, B.E.; Calvert, A.E.; Blair, C.D.; Roehrig, J.T.; Huang, C.Y.H. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion. *Virology* **2011**, *413*, 118–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Liu, H.; Liu, Y.; Wang, S.; Zhang, Y.; Zu, X.; Zhou, Z.; Zhang, B.; Xiao, G. Structure-based mutational analysis of several sites in the E protein: Implications for understanding the entry mechanism of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 5668–5686. [[CrossRef](#)]
187. Chambers, T.J.; Nickells, M. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Genetic and biological characterization of a highly mouse-neurovirulent virus and its infectious molecular clone. *J. Virol.* **2001**, *75*, 10912–10922. [[CrossRef](#)]
188. Hasegawa, H.; Yoshida, M.; Shiosaka, T.; Fujita, S.; Kobayashi, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* **1992**, *191*, 158–165. [[CrossRef](#)]
189. Lee, E.; Hall, R.A.; Lobigs, M. Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses. *J. Virol.* **2004**, *78*, 8271–8280. [[CrossRef](#)]
190. Du, R.; Wang, M.; Hu, Z.; Wang, H.; Deng, F. An in vitro recombination-based reverse genetic system for rapid mutagenesis of structural genes of the Japanese encephalitis virus. *Virol. Sin.* **2015**, *30*, 354–362. [[CrossRef](#)]
191. Huang, C.Y.H.; Butrapet, S.; Moss, K.J.; Childers, T.; Erb, S.M.; Calvert, A.E.; Silengo, S.J.; Kinney, R.M.; Blair, C.D.; Roehrig, J.T. The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion. *Virology* **2010**, *396*, 305–315. [[CrossRef](#)]
192. Zhang, F.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Cheng, Y.; Lee, E.M.; Wen, Z.; Qian, X.; Nguyen, H.N.; Li, Y.; Yao, B.; et al. Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8610–8620. [[CrossRef](#)]
193. Lee, E.; Lobigs, M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* **2008**, *82*, 6024–6033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Nickells, M.; Chambers, T.J. Neuroadapted yellow fever virus 17D: Determinants in the envelope protein govern neuroinvasiveness for SCID mice. *J. Virol.* **2003**, *77*, 12232–12242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Ryman, K.D.; Ledger, T.N.; Campbell, G.A.; Watowich, S.J.; Barrett, A.D. Mutation in a 17D-204 vaccine substrain-specific envelope protein epitope alters the pathogenesis of yellow fever virus in mice. *Virology* **1998**, *244*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Nickells, J.; Cannella, M.; Droll, D.A.; Liang, Y.; Wold, W.S.M.; Chambers, T.J. Neuroadapted yellow fever virus strain 17D: A charged locus in domain III of the E protein governs heparin binding activity and neuroinvasiveness in the SCID mouse model. *J. Virol.* **2008**, *82*, 12510–12519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Mandl, C.W.; Allison, S.L.; Holzmann, H.; Meixner, T.; Heinz, F.X. Attenuation of tick-borne encephalitis virus by structure-based site-specific mutagenesis of a putative flavivirus receptor binding site. *J. Virol.* **2000**, *74*, 9601–9609. [[CrossRef](#)]
198. Tajima, S.; Shibasaki, K.I.; Taniguchi, S.; Nakayama, E.; Maeki, T.; Lim, C.K.; Saijo, M. E and prM proteins of genotype V Japanese encephalitis virus are required for its increased virulence in mice. *Heliyon* **2019**, *5*, e02882. [[CrossRef](#)]
199. van der Most, R.G.; Corver, J.; Strauss, J.H. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. *Virology* **1999**, *265*, 83–95. [[CrossRef](#)]
200. Huang, Y.-J.S.; Higgs, S.; Home, K.M.; Vanlandingham, D.L. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses* **2014**, *6*, 4703–4730. [[CrossRef](#)]
201. Muylaert, I.R.; Chambers, T.J.; Galler, R.; Rice, C.M. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: Effects on virus replication and mouse neurovirulence. *Virology* **1996**, *222*, 159–168. [[CrossRef](#)]

202. Lai, C.J.; Zhao, B.T.; Hori, H.; Bray, M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5139–5143. [[CrossRef](#)]
203. Kato, F.; Kotaki, A.; Yamaguchi, Y.; Shiba, H.; Hosono, K.; Harada, S.; Saijo, M.; Kurane, I.; Takasaki, T.; Tajima, S. Identification and characterization of the short variable region of the Japanese encephalitis virus 3' NTR. *Virus Genes* **2012**, *44*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Filomatori, C.V.; Carballeda, J.M.; Villordo, S.M.; Aguirre, S.; Pallarés, H.M.; Maestre, A.M.; Sánchez-Vargas, I.; Blair, C.D.; Fabri, C.; Morales, M.A.; et al. Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Manzano, M.; Reichert, E.D.; Polo, S.; Falgout, B.; Kasprzak, W.; Shapiro, B.A.; Padmanabhan, R. Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22521–22534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. Sakai, M.; Muto, M.; Hirano, M.; Kariwa, H.; Yoshii, K. Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR. *Virus Res.* **2015**, *203*, 36–40. [[CrossRef](#)]
207. Khou, C.; Pardigon, N. Identifying Attenuating Mutations: Tools for a New Vaccine Design against Flaviviruses. *Intervirology* **2017**, *60*, 8–18. [[CrossRef](#)]
208. Ahmad, Z.; Poh, C.L. The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. *Int. J. Med. Sci.* **2019**, *16*, 355–365. [[CrossRef](#)]
209. Velay, A.; Paz, M.; Cesbron, M.; Gantner, P.; Solis, M.; Soulier, E.; Argemi, X.; Martinot, M.; Hansmann, Y.; Fafi-Kremer, S. Tick-borne encephalitis virus: Molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* **2019**, *45*, 472–493. [[CrossRef](#)]
210. Voßmann, S.; Wieseler, J.; Kerber, R.; Kümmerer, B.M. A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production. *J. Virol.* **2015**, *89*, 4951–4965. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 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/>).

II. Objectifs

Le VWN est un virus neurotrope du genre *Flavivirus* retrouvé sur l'ensemble de la surface du globe. En 1999, une épidémie de grande envergure éclate sur le continent américain, entraînant des cas mortels dans l'avifaune sauvage mais également chez les chevaux ou chez l'humain. Cela marque le début d'une expansion des travaux de recherche sur le VWN (Fig.35) afin de mieux comprendre son cycle de transmission et mieux réagir face aux épidémies futures.

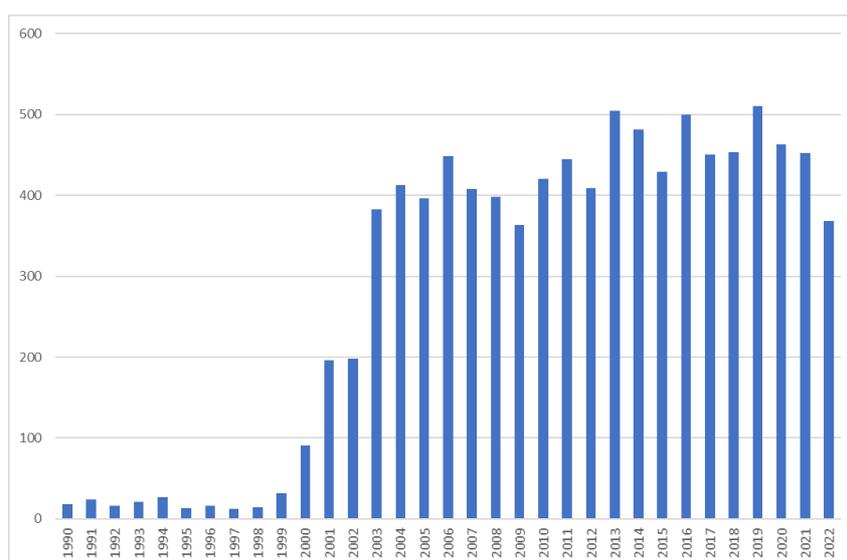


Figure 35. Évolution des publications sur West Nile référencées dans PubMed®.

La ré-émergence du virus en Europe au cours de la fin des années 1990 est totalement différente avec des foyers d'infections sporadiques, d'ampleur limitées. Jusqu'en 2004, le virus circule principalement de façon irrégulière notamment en raison des mouvements de migration aviaire en provenance du continent africain où le virus circule de façon endémique. Il perdure dans un cycle faisant intervenir les oiseaux comme hôtes amplificateurs et les moustiques, principalement du genre *Culex*, comme vecteurs. La sévérité des cas d'infection chez l'Homme, le cheval et dans l'avifaune varie en fonction des souches de virus et en fonction de l'hôte considéré. Il est de ce fait responsable de foyers d'intensité variable chez les hôtes vertébrés comme ça a été le cas en Israël en 1998 (WNV-IS98 fortement pathogène, nombreux cas humains et cas aviaires) et en Italie en 2008 (WNV-IT08, faiblement pathogène, quelques cas humains). L'éco-épidémiologie des souches européennes responsables de foyers d'infection anciens tels que ceux décrits pour WNV-IS98 ou IT08 ou plus récemment en 2018 et 2022, reste peu caractérisée, hétérogène et imprévisible. Nous émettons l'hypothèse que ces différences pourraient être dues à des différences de virulence des souches circulantes. L'objectif général des groupes de recherche dans lesquels nous avons évolué consiste à identifier des signatures virales prédictives du potentiel épidémique d'une souche WNV émergente sur la base de sa caractérisation génétique et ainsi à évaluer

l'impact de toutes modifications génomiques sur la pathogénicité et la transmissibilité du virus afin d'anticiper au mieux de futures épidémies/épizooties sur le continent européen.

De nombreuses études sur les facteurs moléculaires de la virulence du VWN ont été menées jusqu'à aujourd'hui principalement sur des souches américaines (WNV-NY99), australiennes (Kunjin) et africaines en utilisant la génétique inverse. Peu de données sont actuellement disponibles concernant les souches européennes et ne permettent pas d'évaluer les facteurs viraux d'émergence ou de diffusion des souches West Nile en Europe. C'est dans ce contexte que nous avons souhaité caractériser les déterminants moléculaires de virulence impliqués dans les différences de virulence observées entre des isolats méditerranéens et européens en prenant comme modèle d'études les souches WNV-IS98 et IT08.

La première partie de cette thèse s'est appuyée sur des travaux de génétique inverse entre les souches WNV-IS98 et IT08 initiés par Steeve Lowenski. Deux chimères IS98-IT08 ciblant essentiellement la fin du génome viral, à savoir de la protéine NS4A aux premiers nucléotides de la région non codante 3'UTR avaient été générées par une technique classique de génétique inverse faisant intervenir l'utilisation de plasmides et avaient été caractérisées *in vivo* sur des modèles mammifère et aviaire.

La première étape du projet visait donc à consolider cette étude et à caractériser le comportement des chimères virales dans des modèles cellulaires mammifères et aviaires.

Afin de compléter les chimères à disposition pour étudier les différences de virulence d'IS98 et IT08, la deuxième partie du projet visait à réaliser 6 nouvelles chimères, permettant d'évaluer l'effet de modification tout au long du génome, principalement en ciblant les protéines non-structurales, très peu étudiées, comme montré dans notre revue de la littérature. Pour gagner en efficacité sur la génération de virus génétiquement modifiés, nous avons choisi d'utiliser une méthode innovante de génétique inverse, la méthode ISA (Infectious Subgenomics Amplicons). Afin de mieux comprendre le rôle des modifications génétiques dans l'ensemble du cycle de répllication virale, la capacité répllicative des virus chimériques et parentaux a été évaluée *in vitro* sur des cellules de moustiques C6/36 ainsi que sur des cellules de mammifères (Vero). Ces données ont été complétées par des infections *in vivo* sur un modèle mammifère murin BALB/cByJ, ainsi que par des analyses de compétence vectorielle via gorgement artificiel de *Culex pipiens*.

Dans le troisième volet de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à la mutation NS3_{P249T} réduisant très fortement la pathogénicité du VWN chez un hôte aviaire naturel (corneille, *Corvus corone*) et en modèle mammifère (souris BALB/cByJ). Nous avons par ailleurs réalisé l'analyse de la compétence vectorielle de moustiques européens *Culex* vis-à-vis du virus sauvage NS3_{P249} et du virus mutant NS3_{T249}, permettant de questionner le rôle de la mutation NS3_{P249T} dans la répllication virale et la transmission chez le moustique. Ceci n'avait à notre connaissance jamais été réalisé auparavant.

Pour finir, la dernière partie du projet s'articule autour de l'étude de la compétence vectorielle des espèces de moustiques retrouvées dans la nature, en Guadeloupe. Des piégeages sur le terrain ont été réalisés afin de mieux comprendre le rôle des espèces de Guadeloupe dans une possible transmission du virus dans la Caraïbe.

III. Résultats

1. Introduction de la partie 1

Dans cette première partie, l'étude de la virulence du VWN a été appréhendée en réalisant des chimères virales entre deux souches de lignée 1, connues pour leur différence de virulence en condition naturelle. En effet, la souche Israël 1998 est une souche virale génétiquement très proche de la souche New-York 1999 (99,8% d'homologie de séquence). Bien que cette souche ait longtemps été considérée comme la souche responsable de l'épizootie de 1999 à New-York, des études phylogénétiques suggèrent que West Nile Israël 1998 et West Nile New-York 1999 ne seraient pas directement liées mais issues d'un ancêtre commun dont la localisation d'origine reste inconnue. La souche West Nile Italie 2008 n'a au contraire induit qu'une faible mortalité dans l'avifaune sauvage et chez les mammifères en Europe (Savini et al. 2008) (Monaco et al. 2010). Des infections expérimentales chez le poulet SPF ont également pu confirmer une différence significative de virulence entre ces deux souches (Dridi et al. 2014).

Des facteurs biotiques et abiotiques peuvent expliquer la différence d'incidence d'une épizootie. Comme facteurs abiotiques, nous pouvons citer les facteurs environnementaux tels que la disponibilité des espèces hôtes ou vectrices, eux-mêmes directement impactés par les variations climatiques, ou la disponibilité en ressources alimentaires. Toutefois, la sévérité d'une épizootie virale peut également être expliquée par des modifications génétiques virales, impactant le cycle de réplication et de transmission du virus.

Pour étudier les déterminismes génétiques de la virulence, nous avons choisi de nous concentrer tout d'abord sur la partie 3' du génome virale et de réaliser deux premières chimères virales entre les souches Israël 1998 et Italie 2008 en utilisant une méthode plasmidique classique de génétique inverse. Nous avons utilisé un clone infectieux (Bahuon et al. 2012) afin de remplacer sélectivement les protéines NS4A/NS4B et les premiers nucléotides de la protéine NS5 du génome Israël 1998 par les séquences équivalentes de la souche virale Italie 2008. L'analyse comparative *in vitro* et *in vivo* des chimères générées nous a permis de mettre en évidence le rôle de la séquence NS4A/NS4B/5'NS5 dans la diminution de la virulence de la souche West Nile Italie 2008 chez le poulet SPF. Par la suite, nous avons comparé les séquences aux données présentes dans la littérature, ce qui nous a permis de suggérer un rôle possible de la mutation NS4B-E249D dans cette atténuation. Par ailleurs, notre étude de la virulence dans un modèle mammifère murin BALB/cByJ nous a permis de mettre en avant une virulence accrue de la souche Israël 1998 par rapport aux trois autres virus, suggérant l'intervention d'autres déterminants moléculaires dans la virulence chez le mammifère. Enfin nous avons réalisé une analyse comparative des séquences peptidiques de la protéine NS5 afin de proposer les changements NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V and NS5-R422K comme des cibles potentiellement impliquées dans la modification de la virulence chez le mammifère. Finalement nos résultats renforcent les connaissances montrant que les déterminants moléculaires de virulence du VWN varient en fonction de l'hôte considéré.

1.1. Partie 1: ARTICLE 1: Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR genetic determinants of WNV lineage 1 virulence in birds and mammals

Article publié, *Viruses*, 2023.

Article

Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR Genetic Determinants of WNV Lineage 1 Virulence in Birds and Mammals

Lise Fiacre ^{1,2,3,†}, Steeve Lowenski ^{1,†}, Céline Bahuon ¹, Marine Dumarest ¹, Bénédicte Lambrecht ⁴, Maha Dridi ⁴, Emmanuel Albina ^{2,3}, Jennifer Richardson ¹, Stéphan Zientara ¹, Miguel-Ángel Jiménez-Clavero ^{5,6}, Nathalie Pardigon ⁷, Gaëlle Gonzalez ^{1,‡} and Sylvie Lecollinet ^{1,*,‡}

¹ Animal Health Laboratory, L'alimentation et L'environnement (INRAE), Institut National de Recherche pour L'agriculture, École Vétérinaire d'Alfort (ENVA), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de L'environnement et du Travail (ANSES), UMR Virology, 94700 Maisons-Alfort, France

² Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), UMR ASTRE, 97170 Petit-Bourg, France

³ ASTRE, CIRAD, INRAE, University of Montpellier, 34000 Montpellier, France

⁴ SCIENSANO, Avian Virology and Immunology, 1180 Brussels, Belgium

⁵ Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), CSIC, Carretera Algete-El Casar s/n, 28130 Valdeolmos, Spain

⁶ CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28001 Madrid, Spain

⁷ Institut Pasteur, URE ERI/CIBU, 75015 Paris, France

* Correspondence: sylvie.lecollinet@cirad.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ These authors contributed equally to this work.



Citation: Fiacre, L.; Lowenski, S.; Bahuon, C.; Dumarest, M.; Lambrecht, B.; Dridi, M.; Albina, E.; Richardson, J.; Zientara, S.; Jiménez-Clavero, M.-Á.; et al. Evaluation of NS4A, NS4B, NS5 and 3'UTR Genetic Determinants of WNV Lineage 1 Virulence in Birds and Mammals. *Viruses* **2023**, *15*, 1094. <https://doi.org/10.3390/v15051094>

Academic Editors: Daniel Cadar and Yannick Simonin

Received: 22 March 2023

Revised: 21 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 29 April 2023



Copyright: © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: West Nile virus (WNV) is amplified in an enzootic cycle involving birds as amplifying hosts. Because they do not develop high levels of viremia, humans and horses are considered to be dead-end hosts. Mosquitoes, especially from the *Culex* genus, are vectors responsible for transmission between hosts. Consequently, understanding WNV epidemiology and infection requires comparative and integrated analyses in bird, mammalian, and insect hosts. So far, markers of WNV virulence have mainly been determined in mammalian model organisms (essentially mice), while data in avian models are still missing. WNV Israel 1998 (IS98) is a highly virulent strain that is closely genetically related to the strain introduced into North America in 1999, NY99 (genomic sequence homology > 99%). The latter probably entered the continent at New York City, generating the most impactful WNV outbreak ever documented in wild birds, horses, and humans. In contrast, the WNV Italy 2008 strain (IT08) induced only limited mortality in birds and mammals in Europe during the summer of 2008. To test whether genetic polymorphism between IS98 and IT08 could account for differences in disease spread and burden, we generated chimeric viruses between IS98 and IT08, focusing on the 3' end of the genome (NS4A, NS4B, NS5, and 3'UTR regions) where most of the non-synonymous mutations were detected. In vitro and in vivo comparative analyses of parental and chimeric viruses demonstrated a role for NS4A/NS4B/5'NS5 in the decreased virulence of IT08 in SPF chickens, possibly due to the NS4B-E249D mutation. Additionally, significant differences between the highly virulent strain IS98 and the other three viruses were observed in mice, implying the existence of additional molecular determinants of virulence in mammals, such as the amino acid changes NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V, and NS5-R422K. As previously shown, our work also suggests that genetic determinants of WNV virulence can be host-dependent.

Keywords: West Nile virus; molecular determinants; virulence; reverse genetics

1. Introduction

West Nile virus (WNV) is a flavivirus belonging to the family *Flaviviridae*, like Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV), and belongs to the Japanese encephalitis virus (JEV)

serocomplex. It was first isolated in 1937 from the blood of a woman at Omogo, in the West Nile district of North-Western Uganda, in Africa [1]. The WNV genome is a positive sense single-stranded RNA (+ssRNA) of around 11 kb long, encoding three structural proteins (C, prM, E) and seven non-structural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) generated from a single polyprotein [2]. WNV is maintained in a mosquito-bird-mosquito enzootic transmission cycle, with occasional spillovers to accidental dead-end hosts, humans and horses [3]. Most human infections are asymptomatic, but in the case of symptomatic infections, patients generally suffer from mild febrile illness associated with headaches or fatigue [4]. In severe forms of WNV infection, however, neuroinvasion leads to encephalitis, meningitis, or acute flaccid paralysis [5]. Elderly and immunocompromised persons are at increased risk for development of neuroinvasive West Nile disease [2]. While most human cases occur after mosquito bites, direct human–human transmission has been described after blood transfusion [6], solid organ transplantation [7], or transplacental exposure (CDC). The first case of West Nile neuroinvasive disease acquired after liver transplantation was reported in 2002 in Michigan [8]. In the natural setting, WNV is transmitted by mosquito vectors belonging to the genus *Culex* (*Cx.*), such as *Cx. univittatus* in Africa or the Middle East, *Cx. pipiens*, *tarsalis*, and *quinquefasciatus* in North America, and *Cx. pipiens* and *Cx. modestus* in Europe [9]. The vector competence of *Aedes* (*Ae.*) *albopictus*, belonging to a different mosquito genus, has only been demonstrated experimentally [10]. During its transmission cycle, WNV is able to infect a large variety of bird species, but only avian species belonging to Passeriformes, Falconiformes, Strigiformes, and Charadriiformes appear to be competent vertebrate hosts, with viremia levels high enough to support transmission of WNV to mosquitoes [11].

Before 1996, WNV silent or paucisymptomatic infections had been reported in Africa, Europe, and the Middle East. WNV lineage 1 strains (re)emerged in the 1990s in Romania (1996), Israel (1997–2001), Italy (1998), Russia (1999), and since 1999 in the United States (US), causing more cases of neurological disease in humans and in horses [12,13]. At the end of the summer of 1999, clustered fatalities were reported in American crows (*Corvus brachyrhynchos*), fish crows (*Corvus ossifragus*), and captive birds in the Bronx Zoo, in New York [14]. Meanwhile, an increasing frequency of encephalitis was observed in humans. The two events were finally attributed to WNV transmission and neuropathology, as a result of virus detection and sequencing [14–16]. Since 1999, WNV has been responsible for 56,000 reported human cases including more than 28,000 neuroinvasive cases and 2700 deaths, underscoring WNV as one of the most important zoonotic diseases in North America [17]. Phylogenetic analysis showed that the US NY99 strain was most closely related (>99.8% nucleotide identity) to a virus strain isolated from the brain of a dead goose in Israel in 1998 (IS98) [15], suggesting that WNV emergence in the US arose from viral introduction from the Middle East (whether through anthropogenic activities supporting the introduction of infected vectors or birds, or through bird migration).

WNV has been (re)emerging throughout Europe over the last 15 years, associated with the spread of recently-introduced lineage 2 strains. The year 2018 was marked by an exceptional upsurge of WNV outbreaks in Europe, with 2083 autochthonous human cases and 187 deaths reported in 15 different countries [18]. In 2022, Europe experienced another intense WNV transmission season: 1191 human cases of WNV infection were identified in 11 countries, including 586 in northern Italy, where newly introduced lineage 1 virus and lineage 2 strains co-circulated [19]. These observations highlight the need for better characterization of determinants of WNV virulence and pathogenesis. Future WNV outbreaks are particularly difficult to predict, as they depend on multiple environmental factors including temperature, humidity, mosquito distribution, abundance and diversity, resident bird populations, and bird migration routes [20–22], as well as on intrinsic viral factors (strain virulence, replication properties, etc.). Novel methodologies are needed to enhance preparedness and control, should a highly virulent strain of WNV emerge in Europe. By identifying virulence markers of European and Mediterranean WNV strains, new screening tools could be developed to predict the virulence of emerging strains and

anticipate their spread, and safe and effective attenuated WNV vaccines for humans could be developed [23]. Six human vaccine candidates have entered phase 1 and 2 clinical trials, but none are commercially available [24–30].

Researchers have long been using molecular technologies including reverse genetics for precise modification of the virus genome and creation of WNV mutants or chimeras to identify residues involved in WNV virulence; most of these studies have been carried out with the NY99 strain [31,32], while additional data for European Mediterranean and African lineage 1 and 2 virulent strains are strongly needed [33].

Israel experienced intense and recurrent WNV epidemics in 1997–2001 (35 and 417 human neuroinvasive cases in 1998 and 2000, respectively), associated with the isolation of a highly virulent lineage 1 strain belonging to the Israelo-American cluster [34,35]. Of note, the Israel 1998 (IS98) WNV strain displays more than 99% identity with the NY99 strain and has been found to be highly virulent in domestic and wild birds, leading to high fatality rates in geese and white storks. In 2008, a new epidemic lineage 1 strain emerged in Italy (IT08), causing little mortality in wild birds. These observations suggest that the two Mediterranean lineage 1 strains IS98 and IT08 have genetic differences driving differential virulence for birds. Dridi et al. [36] tested this hypothesis by infecting specific-pathogen free (SPF) chicks either with IS98 strain or IT08 strain and showed a significant increase in the mortality of chicks infected with IS98 through the intracranial route.

WNV non-structural (NS) proteins play key roles in virus replication and the control of host immune responses, as well as in virus virulence [31]. In this regard, the NS4A protein is involved in viral replication and regulates the helicase activity of NS3 [37,38]. NS4B is specifically involved in immune evasion by acting on the type I interferon (IFN) signaling pathway [39]. NS4A and NS4B proteins have been shown to influence WNV virulence in mammal hosts [40,41], avian hosts [42], and in mosquito vectors [43], and have also been identified as virulence factors in other flaviviruses, including DENV [44], JEV [45], or yellow fever virus (YFV) [46]. The NS5 WNV protein is the virus polymerase and methyltransferase, which is critical in viral replication and is recognized as a virulence determinant for WNV in mammalian hosts [47]. Few studies have addressed the importance of the 3'-untranslated region (UTR) region in WNV virulence [48]. In this context, the present study aimed to gain better understanding of the roles of NS4, NS5, and 3'UTR regions in WNV virulence, using chimeric constructs between NS4/NS5/3'UTR regions of high- and low-virulence strains for birds, IS98 and IT08, respectively, and more particularly, to identify which regions were responsible for the difference in virulence observed between these two strains [36].

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines and Viruses

Viral production, as well as the study of growth kinetics, was achieved by using Vero cells. Growth kinetics were also assessed on CCL141 cells. Vero cells (ATCC CCL-81) were maintained at 37 °C, 5% CO₂ in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1 mM sodium pyruvate, and penicillin (1 U/mL)/streptomycin (1 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific). The CCL141 cell line (provided by Nolwenn Jouvenet, Institut Pasteur de Paris) was maintained at 37 °C, 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS, Lonza, and antibiotics as described above.

The infectious cDNA clone derived from IS98, a highly virulent strain isolated from a white stork, *Ciconia ciconia* (IC-WNV-IS98; Genbank accession number: KR107956.1), was constructed as described by Bahuon et al., and cleared virus supernatants obtained after a single passage in Vero cells were used in *in vitro* and *in vivo* infections [49]. The parental WT-WNV-Italy 2008 15803 strain, WNV-IT08 (Genbank accession number: FJ483549.1), was isolated from a magpie, *Pica pica*, in 2008 at IZSLER and passaged once in Vero cells. This first-passage virus was used in the following experiments.

2.2. Generation of Chimeric Viruses

The chimeric viruses were generated using protocols adapted from Bahuon et al. [49]. Briefly, genomic RNA from WNV-IT08 was extracted using the QIAmp viral RNA kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two specific RNA fragments covering 2 regions of the 3'-end of the virus genome were reverse transcribed using the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Two genomic fragments were amplified using primers 5761F 5'-CGTGCTGGAAAGAAAGTAGTC-3', 8100R 5'-GTAGAACACATCCACTCCACTC-3' for the first chimera and 7993F 5'-GAAGTCAGAGGGTACACAAAGG-3', 10894R 5'-TCCTCCCCTGACCTACA-3' for the second chimera (positions can be found on the virus genome in Figure 1). These were individually cloned into the pCR2.1 plasmid and then subcloned into the IC-WNV-IS98 plasmid following enzymatic digestion to generate cDNA clones of two chimeric viral genomes, IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR. These were propagated in *E. coli* DH5 α (Thermo Fisher Scientific) at room temperature. Corresponding plasmids were linearized and transcribed in vitro using the Sp6 MEGascript High yield transcription kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Montigny-le Bretonneux, France). Vero cells were electroporated with 20 μ g of RNA transcripts, before being mixed with DMEM supplemented with 2% FBS and incubated in a T-25 flask (5% CO₂ at 37 °C) until observation of a cytopathic effect (CPE). This is referred to as a passage 0, P0. At day 2 post-infection (pi), 1 mL of P0 supernatants was used to infect new Vero cells in T-25 flasks (referred to as passage 1, P1). Three days pi, after observation of CPE, viruses were harvested, and supernatants were aliquoted and stored at -80 °C. The 2 chimeric viruses were titrated by plaque assay on Vero cells.

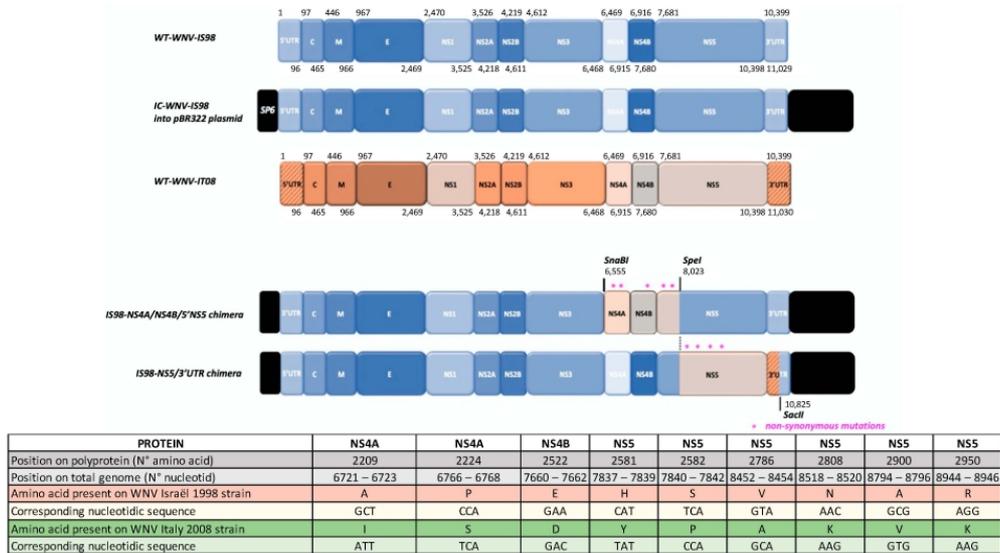


Figure 1. Genomic positions of genomic fragments exchanged between WNV IS98 and IT08 strains in IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR chimeras. Blue and orange fragments originate from IS98 and IT08 genomes, respectively. Non-synonymous mutations are represented by pink stars. Restriction enzyme sites used for cloning (SnaBI, SpeI, SacII) are indicated.

2.3. WNV Plaque Phenotype

Vero cells were seeded in 6-well plates and infected with either the IC-WNV-IS98, parental WT-WNV-IT08 strain or chimeric viruses IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR at 20 PFU for 1 h 30 min at 37 °C, 5% CO₂. The inoculum was discarded, and cells were overlaid with 2% SeaPlaque agarose in MEM 1 \times , supplemented with 5% FBS, 1% sodium pyruvate, 1 U/mL of penicillin and 1 mg/mL of streptomycin, and incubated

for 3 days at 37 °C, 5% CO₂. Once the agarose was removed, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.4% crystal violet for 24 h in a humid chamber at 37 °C.

2.4. Viral Growth Kinetics

Vero and CCL141 cells were seeded in 12-well plates and infected with IC-WNV-IS98, parental WT-WNV-IT08 strain or chimeric viruses IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR at different MOIs (1, 0.1, and 0.01) in DMEM supplemented with 2% FBS. The cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂, and cell supernatants were harvested at the indicated times post-infection (17 h, 24 h, 48 h, and 72 h). Viral titers were determined by quantitative RT-PCR and TCID₅₀ on Vero cells.

2.5. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the MagVet Universal Isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse-transcribed and amplified using the AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) as previously described [1]. For specific amplification of the viral genome, primers WNproC-10 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3' and WNproC-132 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' targeting the 5'UTR and C regions (total length: 123 nucleotides) were used with the probe 5'-FAM-CCTGGTTCTTAGACATCGAGATCT-Tamra-3' [50]. The primers ACTB-966 5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3' and ACTB-1096 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' were used to amplify cellular RNA with the probe 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTCCAGCAGATGT-TAMRA-3' (total length of the ACTB amplicon: 131 nucleotides) [51]. Primers and probes were used at a concentration of 0.4 μM and 0.2 μM, respectively. To perform the reaction, 5 μL of RNA was completed to a final volume of 25 μL with reaction mix. Amplification was performed in an AB 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France). The samples were maintained at 45 °C for 10 min and at 95 °C for 10 min and then subjected to 40 cycles consisting of incubations at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. WNV and β-actin RNA standards were used to construct standard curves and quantify viral and cellular RNAs.

2.6. Virus Titration by TCID₅₀

Virus titration was performed in 96-well flat bottom plates. Vero cells were seeded one day prior to infection at a density of 2×10^4 cells/well. Quadruplicate wells were inoculated with ten-fold serial dilutions of virus supernatants (10^{-1} to 10^{-8}). Plates were incubated for 3 days at 37 °C, 5% CO₂, and 50% tissue culture infection dose (TCID₅₀) was determined based on the number of wells displaying CPE at each dilution using the methodology described by Reed and Muench [52].

2.7. Virulence in Mice

Six-week-old Balb/cByJ mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in an environmentally controlled room under biosafety level 3 conditions and were given food and water ad libitum. Animal experiments were approved by the joint Anses-UPEC-Alfort Veterinary School ethic committee (permit number: 15/02/11–13). Seventeen groups of 5 mice were inoculated intraperitoneally with various doses of virus (0.1, 1, 10, and 100 PFU of viruses: WNV-IS98, WNV-It08, IS98-NS4A/NS4B/5'NS5, or IS98-NS5/3'UTR) prepared in PBS or with PBS alone as a negative control. Infected mice were checked at least daily for two weeks and humanely euthanized when the end point was reached, e.g., when at least two of the following clinical signs were observed: weight loss greater than 15%, anorexia, ruffled hair, curved back, loss of balance, or paresis. The presence of viral RNA was confirmed in blood collected at 3 days pi (dpi) and in brain tissue (data not shown), recovered shortly after their death, by RT-qPCR. Total RNA was

extracted using the MagVet Universal Isolation kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions, from 100 μ L of blood or 100 mg of brain tissue. To assess the induction of WNV-antibody in surviving animals at 21 dpi, blood was collected, and serum was separated after centrifugation for 5 min at 2044 RCF. ID Screen West Nile competition ELISA kit (ID Vet, Evreux, France) was performed on mice sera according to the manufacturer's instructions and demonstrated the induction of WNV antibodies in all surviving mice infected with doses ≥ 1 PFU (data not shown).

2.8. Virulence in Specific-Pathogen-Free (SPF) Chickens

Animal experiments on SPF chickens were carried out according to Dridi et al. [36]. SPF chickens, provided by Lohmann Valo (Cuxhaven, Germany), were kept in biosecurity level 3 isolators at CERVA-CODA, and animal experiments were conducted under the authorization and supervision of the Bioethics Committee CODA-IPS (agreement number: LA1230174). Five groups of 10 one-day-old SPF chickens were intracerebrally (50 μ L inoculum/chicken) inoculated with 10^3 TCID₅₀ of virus supernatants or of PBS (control group). Clinical evaluation was performed daily for 14 days. On day 3 pi, 3 chickens/group were sacrificed to collect larger volumes of blood and evaluate viremia by RT-qPCR. The presence of virus in oral swabs and feathers was assessed by RT-qPCR at day 3 and at days 3, 7, and 14 pi, respectively. Two to three wing feather follicles per bird were sampled and stored in 600 μ L of RNA later (RNA Stabilization Reagent, Qiagen Benelux B.V., The Netherlands) at -80 °C for further RNA extraction, as described in [36]; the method used for RNA extraction from feather follicles is also detailed in [36]. Total RNA from 100 μ L of oral swabs or blood samples was extracted using the MagVet Universal Isolation kit (Thermo Fisher Scientific) on the Kingfisher extraction robot (Thermo Fisher Scientific, Lyon, France).

Mortalities were recorded and cadavers removed daily from the isolators, while surviving chickens were finally euthanized at day 14 pi. The brain of dead chickens was sampled for RT-qPCR analysis.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis of in vitro and in vivo results was performed using the non-parametric Kruskal–Wallis or *t*-test mean analysis. All analyses were performed using GraphPad Prism version 7.

3. Results

3.1. Comparison of Genome Sequences of Parental WNV-IS98 and IT08 Strains

The complete genome sequence of the WNV-IS98 strain (GenBank accession number AF481864.1) exhibits 446 nucleotide (nt) differences (4.0%) compared with that of the WNV-IT08 strain (GenBank accession number FJ483549.1). Nucleotide substitutions are distributed throughout the genome (5'UTR: 0 substitutions (0.0%), C protein gene: 6 substitutions (1.6%), prM-M protein gene: 20 substitutions (4.0%), E protein gene: 58 substitutions (3.9%), NS1 protein gene: 40 substitutions (3.8%), NS2A protein gene: 34 substitutions (4.9%), NS2B protein gene: 20 substitutions (5.1%), NS3 protein gene: 85 substitutions (4.6%), NS4A protein gene: 19 substitutions (4.3%), NS4B protein gene: 35 substitutions (4.6%), NS5 protein gene: 104 substitutions (3.8%), 3'UTR: 25 substitutions (4%)) (Figure 2). Within the coding sequence, WNV-IT08 and IS98 differ by 22 non-synonymous mutations (C protein: 0/123 non-synonymous mutation, prM-M protein: 0/167 non-synonymous mutation, E protein: 2/497 non-synonymous mutations (0.4%), NS1: 2/352 non-synonymous mutations (0.6%), NS2A: 3/231 non-synonymous mutations (1.3%), NS2B: 3/131 non-synonymous mutations (2.3%), NS3: 3/619 non-synonymous mutations (4.8%), NS4A: 2/149 non-synonymous mutations (1.3%), NS4B: 1/256 non-synonymous mutation (0.4%), NS5: 6/905 non-synonymous mutations (0.7%)) (Figure 2). While few non-synonymous mutations are found along the genome, WNV-IS98 and IT08 are known to display differen-

tial virulence and lethality in wild birds or SPF chicks [36], suggesting that some of these polymorphisms represent genetic determinants of virulence.

	Non-coding region 5'UTR	Structural protein C prM E			Non-structural protein NS1 NS2A/B NS3 NS4A/B NS5					Non-coding region 3'UTR
Number of synonymous and non-synonymous mutations	-	6	20	58	40	54	85	54	104	25
Number of non-synonymous mutations	-	-	-	2	2	6	3	3	6	-

Non-synonymous mutations

Protein	E	E	NS1	NS1	NS2A	NS2A	NS2A	NS2B	NS2B	NS2B	NS3	NS3	NS3	NS4A	NS4A	NS4B	NS5	NS5	NS5	NS5	NS5	NS5
Amino acid position (on polyprotein)	416	449	808	861	1228	1248	1308	1456	1457	1477	1861	2001	2026	2209	2224	2522	2581	2582	2786	2808	2900	2950
Nucleotide position (on total genome)	1342-1344	1453-1455	1518-1520	2677-2679	3778-3780	3848-3850	4018-4020	4462-4464	4465-4467	4525-4527	5677-5679	6097-6099	6172-6174	6721-6723	6766-6768	7660-7662	7837-7839	7840-7842	8452-8454	8518-8520	8794-8796	8944-8946
Amino acid position (on protein of interest)	126	159	17	70	85	105	165	82	83	103	356	496	521	85	100	249	53	54	258	280	372	422
Amino acid on WNV-IS98	I	V	N	A	I	I	R	G	E	V	T	P	E	A	P	E	H	S	V	N	A	R
Corresponding nucleotide sequence	ATA	GTT	AAT	GCA	ATA	ATT	CGG	GGT	GAA	GTC	ACC	CCG	GAG	GCT	CCA	GAA	CAT	TCA	GTA	AAC	GCG	AGG
Amino acid on WNV-IT08	C	I	S	S	V	T	G	D	G	A	I	L	D	I	S	D	Y	P	A	K	V	K
Corresponding nucleotide sequence	ACA	ATT	AGT	TCA	GTA	ACC	GGG	GAT	GGA	GCC	ATC	CTG	GAT	ATT	TCA	GAC	TAT	CCA	GCA	AAG	GTC	AAG
Mutation name	I126V	V159I	N17S	A70S	S85V	I105T	R165G	G82D	E83G	V103A	T356I	P496L	E521D	A85I	P100S	E249D	H53Y	S54P	V258A	N280K	A372V	R422K
Documented in literature	-	E-159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NS4B-E249G	-	-	-	-	-

Figure 2. Number and location of synonymous and non-synonymous mutations between WNV-IS98 and WNV-IT08.

3.2. Viral Replication in Vero Cells

The efficacy of viral replication and cell-to-cell spread, and hence the size of viral plaques, is correlated with virulence. In particular, small plaques generally denote an attenuated phenotype, whereas large plaques often correspond to highly virulent strains [53]. Analysis of plaque size in Vero cells revealed that the IS98-NS5/3'UTR chimera generated smaller plaques (0.5 mm) than parental WNV-IS98 (1 mm), WNV-IT08 (1.5 mm), and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera (1.5 mm) at 3 dpi (Figure 3). In agreement with the assertion that small plaques would be associated with lower replication or less effective exocytosis, our results suggest that the IS98-NS5/3'UTR chimera could be less virulent than parental viruses. This hypothesis was confirmed by in vivo analysis in mice, in that IS98-NS5/3'UTR induced less mortality than WNV-IS98 (Figure 6). Of note, WNV-IT08 demonstrated lower virulence than WNV-IS98 in an avian model of WNV infection (SPF chicks), but did not show reduced virulence in Vero cells.

3.3. Replication Kinetics of the Parental WNV-IS98 and IT08 and Chimeras thereof in Mammalian and Avian Cell Culture

Vero cells, derived from kidney epithelial cells of an African green monkey, were selected as a mammalian cellular model for evaluation of replication kinetics. Serial samples of cell supernatants were collected at 17, 24, 48, and 72 h post-infection (hpi) and used to quantify total viral RNA (viral genome copies/ μ L) by RT-qPCR and infectious viral titers, by end-point dilution in Vero cells. Total viral RNA was significantly lower for IS98-NS5/3'UTR than for parental WNV-IS98 and IT08 at 17, 48, and 72 hpi (Kruskal–Wallis; $p < 0.05$ for WNV-IT08 at 17 hpi; $p < 0.01$ for WNV-IS98 at 48 and 72 hpi) (Figure 4). Thus, in agreement with the results of the plaque assay (Figure 3), replication kinetics in Vero cells suggests that the IS98-NS5/3'UTR chimera had impaired replication or exocytosis in comparison with parental WNV-IS98 or IT08 strains and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5

chimera. Nevertheless, no differences in infectious viral titers in Vero cell supernatants were observed between parental and chimeric viruses.

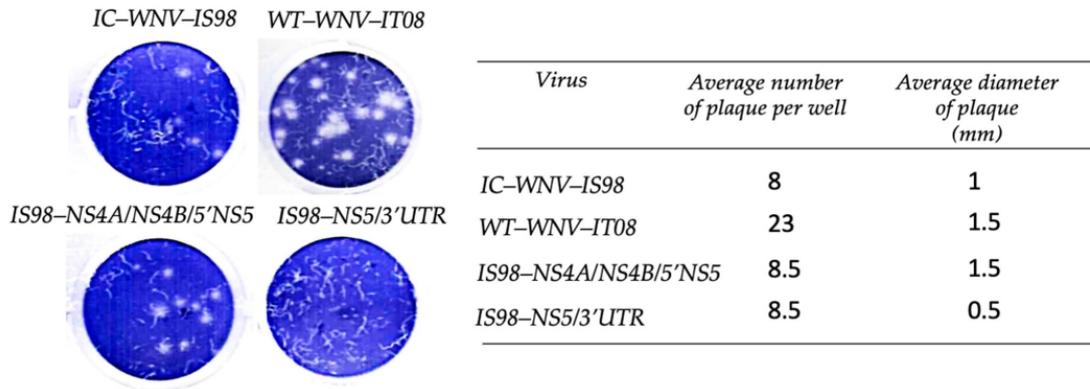


Figure 3. Comparison of plaque size and average number of plaques for IC-WNV-IS98 and WT-WNV-IT08 parental strains and chimeras in Vero cells, at 3 dpi.

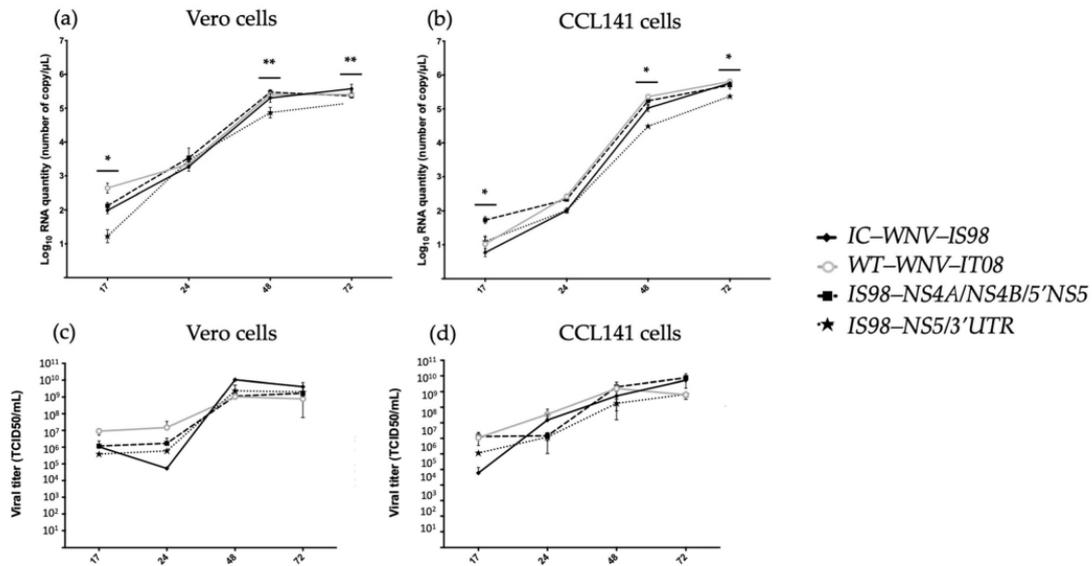


Figure 4. Growth kinetics of IC-WNV-IS98 and WT-WNV-IT08 parental strains and IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR chimeras thereof. Vero and CCL141 cells were infected with the indicated viruses at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. At the indicated time points, cell culture supernatants were collected and their viral RNA content was analyzed either by RT-qPCR (a,b) or by end-point dilution assay (c,d). Statistical comparisons were performed by the non-parametric Kruskal–Wallis test. The error bars indicate standard deviations (SD). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Replication kinetics of parental WNV-IS98 and IT08 and chimeric viruses was also evaluated on the avian cell line, CCL141, derived from duck embryo cells and exhibiting fibroblast morphology. Total viral RNA (viral genome copies/ μL) was significantly lower for the IS98-NS5/3'UTR chimera than for parental WNV-IS98 and IT08 strains at 48 and 72 hpi ($p < 0.05$), while higher replication levels were observed for the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5

chimera at 17 hpi only ($p < 0.05$ with WNV-IS98) (Figure 4). These results suggest that replication for the IS98-NS5/3'UTR chimera was diminished at late time points (48 and 72 hpi), as observed in Vero cells. Nevertheless, while viral titers for the IS98-NS5/3'UTR chimera tended to be lower than those of the parental WNV-IS98 and IT08 strains after 24 h, the difference did not reach statistical significance.

3.4. Replication of Parental and Chimeric Viruses in BALB/cByJ Mice

While cellular models can be informative regarding the intrinsic replicative capacity of viruses, virulence, being a complex trait, can only truly be assessed *in vivo*. To this end, we performed analyses in mice, as they are highly susceptible to WNV infection and develop clinical signs closely similar to those in humans, including such neurological features as paralysis. *In vivo* analyses also permit analysis of viremia, which reflects viral replication at the inoculation point and subsequent dissemination via the hematogenous route. Peak viremia typically occurs at 2 to 3 dpi.

At 3 dpi, at the expected peak of viremia, viral load was analyzed by RT-qPCR for mice infected with WNV-IS98, IT08, and the two chimeric viruses. Viremia was observed to be similar at 3 dpi for IC-WNV-IS98, WNV-IT08, and the chimera IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 (Figure 5). The IS98-NS5/3'UTR chimera, however, induced a significantly lower viremia than the other tested viruses, suggesting a reduced replicative capacity for this chimera in mice ($p < 0.05$).

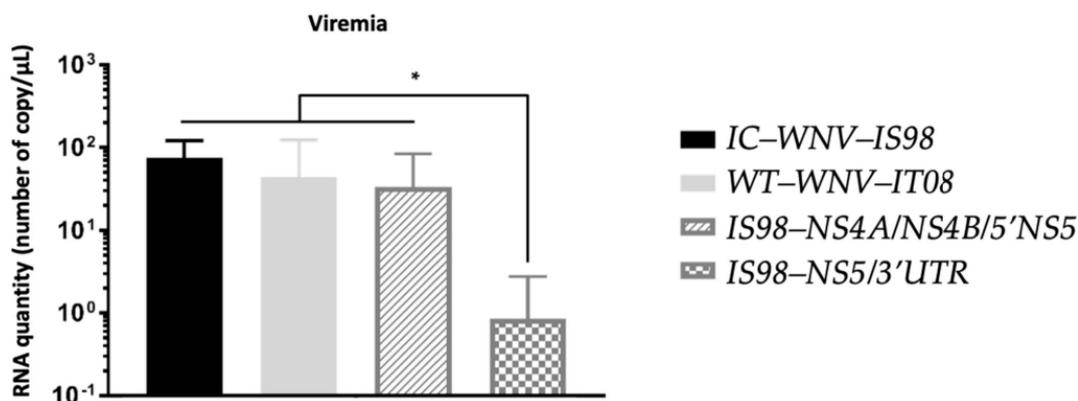
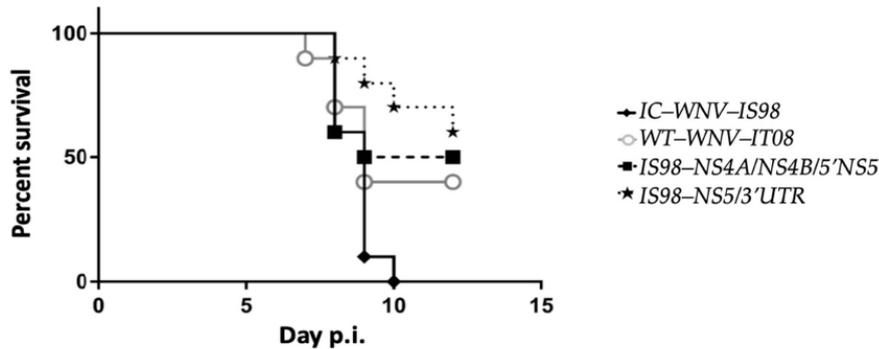


Figure 5. Viremia 3 days after intraperitoneal inoculation of female BALB/cByJ mice with 1 PFU of IC-WNV-IS98, WT-WNV-IT08, and chimeras. Viral load in blood was quantified by RT-qPCR. *, $p < 0.05$.

3.5. Neuroinvasion and Neurovirulence of Parental Strains and Chimeras in BALB/cByJ Mice

Neuroinvasion and neurovirulence properties of IC-WNV-IS98, WT-WNV-IT08, and chimeras IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR were examined following intraperitoneal (i.p.) inoculation of six-week-old female BALB/cByJ mice. Mice were monitored for 21 days.

At the dose of 1 PFU, all mice infected with IC-WNV-IS98, a highly virulent strain, died before 10 dpi. By contrast, some mice infected with WT-WNV-IT08 (60%) or by the chimeras IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 (50%) and IS98-NS5/3'UTR (40%) survived the challenge, although these differences were not statistically significant. The median day of death was slightly different between the four groups: 8.7 for IC-WNV-IS98, 8.3 for WT-WNV-IT08, 8.2 for IS98-NS4A/NS4B/5'NS5, and 9.8 for IS98-NS5/3'UTR (Figure 6).



Virus	Dose (PFU)	Mortality (%)	Median day	LD ₅₀ (PFU)
IC-WNV-IS98	1	100	8.7 ± 0.48	0.3
WT-WNV-IT08	1	60	8.3 ± 0.62	0.7
IS98-NS4A/NS4B/5'NS5	1	50	8.2 ± 0.37	1
IS98-NS5/3'UTR	1	40	9.8 ± 1.48	2.5

Figure 6. Neurovirulence of IC-WNV-IS98, WT-WNV-IT08, and chimeras. Survival of 6-week-old female BALB/cByJ mice after i.p. inoculation with 1 PFU of parental strain or chimeras is shown. LD₅₀ determination after i.p. inoculation of BALB/cByJ mice with varying virus doses is also presented.

Moreover, infection with diminishing doses of virus (100, 10, 1, 0.1, and 0.01 PFU) allowed calculation of the lethal dose 50 (LD₅₀) for the different viruses. The LD₅₀ of IC-WNV-IS98 (0.3) tended to be lower than that of WT-WNV-IT08 (0.7) or of the two chimeras IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 (1.0) and IS98-NS5/3'UTR (2.5), but such differences did not attain statistical significance.

Taken together, the survival curves and the LD₅₀ determination tended to suggest that the IS98-NS5/3'UTR and IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimeras were less virulent than WNV-IS98 in the mammalian model (Figure 6). In keeping with this conclusion, viral RNA load in the brain of WNV-infected mice was higher in the group inoculated with IC-WNV-IS98 ($>10^5$ log₁₀ copy RNA/μL) than in the other three groups (between 10^3 and 10^4 log₁₀ copy RNA/μL) (data not shown).

In sum, the in vivo results in female BALB/cByJ mice show that both WNV-IS98 and IT08 parental strains, as well as chimeras thereof, are neuroinvasive and neurovirulent. In agreement with the lower viremia observed at day 3 after i.p. inoculation, the chimera IS-NS5/3'UTR tended to be less neurovirulent and neuroinvasive than the other evaluated viruses (Figure 6).

3.6. Replication of Parental and Chimeric Viruses in SPF Chickens

Birds are the principal amplifying hosts for WNV, and young chicks have been shown to be susceptible to WNV infection and to allow pathotyping of WNV strains. One-day-old SPF chickens were inoculated intracranially (i.c.) and subcutaneously (s.c) (data not shown), at a dose of 10^3 TCID₅₀ and monitored for 14 days pi. As previously shown, WNV strain virulence could be efficiently discriminated after i.c. inoculation in chicks [36]. After i.c. inoculation, peak viremia determined at 3 dpi was similar irrespective of which virus was considered (Figure 7a). Peripheral spread was estimated by RT-qPCR on crushed feather follicles obtained at 3 dpi. Viral RNA load was similar in groups infected with WNV-IS98 and the IS98-NS5/3'UTR chimera, while 1-log lower RNA quantities were reported from feathers sampled in chicks infected with WNV-IT08 and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera (not significant) (Figure 7b). At 3, 7, and 14 dpi, oral swabs were taken to estimate virus excretion levels, and viral RNA measured by RT-qPCR. Viral RNA was no longer detectable in oral swabs collected at 14 dpi (data not shown). While no significant differ-

ences were observed at 3 dpi, the parental IT08 strain and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera displayed significantly less viral RNA at 7 dpi than the WNV-IS98 parental strain (Figure 7c, $p < 0.05$).

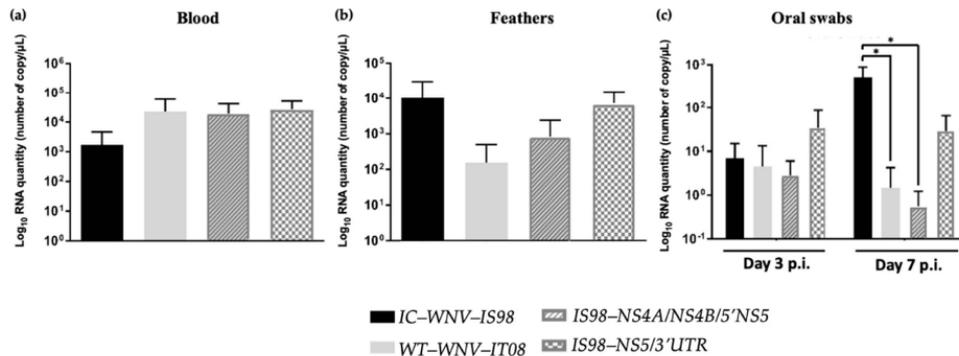


Figure 7. Viral titers in (a) blood at 3 dpi, (b) feathers at 3 dpi, (c) oral swabs of one-day-old SPF chickens at 3 and 7 dpi after i.c. inoculation of 10^3 TCID₅₀ of parental strains and chimeras. *, $p < 0.05$.

3.7. Neurovirulence of Parental Strains and Chimeras in SPF Chickens

Neurovirulence of the parental strains and chimeras were compared by survival curve analyses (Figure 8a) and viral RNA quantification in brain by RT-qPCR (Figure 8b). When infected by the i.c. route, survival curves of WNV-infected SPF chicks showed significant differences between IC-WNV-IS98 and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera ($p < 0.05$). Although statistically significant differences were only observed between IC-WNV-IS98 and the chimera IS98-NS4A/NS4B/5'NS5, comparable survival curves were reported for WT-WNV-IS98 and the IS98-NS5/3'UTR chimera and for WT-WNV-IT08 and the IS98-NS5/3'UTR (Figure 8a). Similar observations were obtained after viral RNA quantifications on feathers at 3 dpi and in oral swabs at 7 dpi (Figures 7c and 8b).

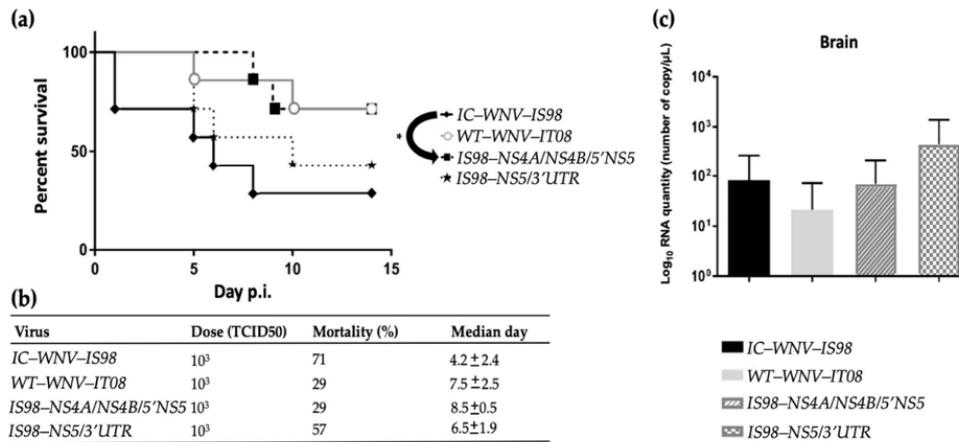


Figure 8. Neurovirulence of IC-WNV-IS98, WT-WNV-IT08, and their chimeras in one-day-old SPF chickens. Chickens were infected intracerebrally with 10^3 TCID₅₀ and monitored for 14 dpi. (a) Survival growth. (b) Mortality and median day of death are presented. (c) Viral titer in the brain of dead chicks assessed by RT-qPCR. *, $p < 0.05$.

Viral RNA quantification in the brain of dead chicks did not reveal any statistically significant difference among the studied viruses.

4. Discussion

The aim of this study was to gain understanding of the genetic determinants of WNV virulence, and in particular those that distinguish the highly virulent lineage 1 strain IS98 [49] and the less virulent lineage 1 strain IT08, isolated from wild birds during Mediterranean outbreaks of WNV that took place in 1998 and 2008, respectively. To this end, molecular chimeras of the WNV-IS98 and IT08 strains were generated by reverse genetics. The biological properties of parental and chimeric viruses were compared in mammalian and avian cell culture models, and virulence was assessed *in vivo* in both mammals and birds, and more particularly in mice and the 1-day old chick [36], respectively. We found that replacement of the IS98 sequence encoding NS4A, NS4B, and the 5' portion of NS5 by corresponding sequences of the less virulent IT08 strain significantly diminished viral load in chicks at 7 dpi and improved survival, suggesting that certain nucleotide substitutions between the two parental viruses within the exchanged genomic region represent genetic determinants of WNV virulence in birds.

Comparison of WNV-IS98 and IT08 genomic sequences showed that around 40% of the 446 nucleotide substitutions that distinguish the viruses were located in the 3' region of the genome, over a segment spanning NS4-3'UTR. Twenty-three percent of the 446 mutations were detected in the NS5 coding region. Only 22 of the 446 nucleotide substitutions represented non-synonymous mutations, and, of these, 9 were evidenced in the NS4-3'UTR segment, with 3 and 6 non-synonymous mutations in NS4A/B and NS5 coding sequences, respectively (Figure 2). Based on such findings, we hypothesized that NS4A/B and NS5 proteins were good candidates for investigation of the genetic determinants that distinguish the virulence of WNV-IS98 and IT08.

Our hypothesis was also supported by previous studies that had identified virulence markers in WNV NS proteins. Around two thirds of the genome encode NS proteins, which are essential for virus replication. NS4A and B regulate the ATPase activity of the NS3 helicase and play a role in viral replication [54] and in immune evasion through inhibition of the type-I IFN pathway [55]. NS5 is composed of an N-terminal methyltransferase (MTase) and a C-terminal RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [56] domain. Many mutations at the 3' end of the genome, including NS4A-Q46K [37], NS4A-Q47K [37], NS4A-D50K [37], NS4B-P38G [41], NS4B-C102S [41], NS5-K61A [57], NS5-D146A [57], NS5-K182A [57], NS5-E218A [47], NS5-A804V [48], 3'UTR-A10596G [48], 3'UTR-C10774 [48], and 3'UTR-A10799G [48], have previously been shown to have an impact on WNV virulence in mammals. In birds, however, molecular determinants modulating WNV virulence have been poorly characterized. At the 3' end of the genome, only a single mutation, NS4A-F92L, has previously been described as affecting avian virulence in birds [58]. The NS5 protein is the most highly conserved NS protein among flaviviruses, and thus a preferred target for development of antiviral drugs against DENV and flaviviruses in general [59]. Though its role in WNV virulence in mammals has been documented [31], no data are available for NS5 in birds. For all these reasons, we decided to compare parental WNV-IS98 and IT08 strains and two chimeric constructs thereof, IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR, *in vitro* and *in vivo* and in both mammalian and avian models, to elucidate host-dependent virulence factors.

Measurement of growth kinetics in the duck embryo cell line CCL141 revealed that early replication of IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 was more efficient than that of WNV-IS98. Indeed, higher viral RNA loads were obtained at 17 hpi with this chimera, suggesting enhanced molecular mechanisms during the first steps of virus replication in avian cells. However, no differences in viral titer were observed for these viruses. Increase in total viral RNA quantity without a corresponding increase in infectious viral titers in cell supernatants could be explained by increased production of defective viral particles, or the release of unpackaged viral RNA into the supernatant. Synonymous mutations identified in chimeras could also modify interaction of viral RNA with viral or cellular proteins, possibly altering RNA quantity without changing viral infectious titer. In SPF chickens, this chimeric virus proved to be less virulent than WNV-IS98, displaying a lower

viral load as quantified in oral swabs at 7 dpi ($p < 0.05$) and a lower mortality rate at 14 dpi (29% for IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 vs. 100% for WNV-IS98). Of note, the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera and the parental WNV-IT08 strain induced a similar mortality rate. Our *in vitro* and *in vivo* results thus reveal similarities in the replicative features of IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and WNV-IT08 strains in avian models, suggesting that the NS4A/NS4B/5'NS5 region could play a role in the attenuated phenotype of WNV-IT08 compared with WNV-IS98 in birds.

We also conducted experiments in mammalian models, including *in vitro* assays on Vero cells and virulent challenge in BALB/cByJ mice, to evaluate host-dependent responses to genetically modified viruses. *In vitro* analysis of growth kinetics argued in favor of an attenuated phenotype for the IS98-NS5/3'UTR chimera, as shown by smaller plaque sizes and lower viral RNA production relative to those of parental viruses and the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera (Figures 3 and 4). *In vivo*, peak viremia in IS98-NS5/3'UTR-infected mice at 3 dpi was significantly lower than that elicited by other viruses. Moreover, mortality rates at 21 dpi in BALB/cByJ mice suggested that WNV-IS98 was more virulent than the IS98-NS5/3'UTR chimera (100% and 40%, respectively), although the difference did not attain statistical significance.

We sought to predict which substitutions in the IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera were likely to be responsible for its attenuated phenotype in avian models, especially in SPF chicks. We performed a literature review to this effect, whose results are presented in Table 1. In reference to previous studies, the replacement of the glutamic acid residue at position 249 by glycine (NS4B-E249G) would appear to be a good candidate. Indeed, this substitution has not only been identified in an attenuated strain isolated from birds in 2003 in Texas [60], but was also shown to be crucial for conferring an attenuated phenotype in mice [61]. A second amino acid residue in this region, NS4A-92, is known to be implicated in avian virulence (Table 1), but since it is conserved between WNV-IS98 and IT08 strains, it cannot play a role in their differential virulence.

Regarding virulence in mammals, the attenuated phenotype of IS98-NS5/3'UTR observed in mice could be due to mutations in the NS5 protein, whether synonymous or non-synonymous, or in the 3'UTR region. The NS5 protein, which is the largest of the NS proteins, is responsible for the capping and replication of viral RNA, catalyzed by its N-terminal methyltransferase (MTase) and C-ter RNA-dependent-RNA-polymerase (RdRp), respectively [62]. WNV-IS98 and IT08 differ by six non-synonymous mutations in this region: NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A732V, and NS5-R422K. Although none of these have been implicated as yet in WNV virulence in mammals, our results suggest that they would be worth investigating as candidates for the attenuated phenotype of IS98-NS5/3'UTR observed in mice. Moreover, the synonymous mutations in NS5 could also have an impact on virulence by affecting the stability or structure of viral RNA, which could potentially modify interactions between viral RNA and viral or cellular proteins and exert an impact on viral replication.

As NS5 is highly conserved among flaviviruses, we gave this region particular attention for investigation of the differential virulence of WNV-IS98 and IT08, focusing on genetic markers that have been described to determine pathogenicity of other flaviviruses, such as DENV. Several NS5 markers are known to be responsible for enhanced replication and virulence of flaviviruses, mainly DENV, including (i) K-D-K-E catalytic tetrad (NS5-K61-D146-K182-E218), (ii) single mutations NS5-R325A, NS5-R519A, NS5-R769A, NS5-K840A, NS5-R841A, (iii) PDZ-Binding Motifs (PBM motif), and (iv) post-translational modifications. (i) The K-D-K-E tetrad catalyzes 2'O methylation and is highly conserved among flaviviruses. Disruption of the tetrad confers an attenuated phenotype, providing a promising strategy for development of a live attenuated DENV vaccine [57,63]. (ii) Iglesias et al. [64] showed that the listed single mutations NS5-R325A, NS5-R519A, NS5-R769A, NS5-K840A, and NS5-R841A impart high RNA synthesis activity *in vitro* but delayed or impaired replication *in vivo* for DENV. (iii) The PBM motif at the N-terminus of the NS5 protein is widely known to be implicated in virulence. In WNV it comprises three

amino acids, T-V-L, just upstream of the stop codon. The PBM motif is known to bind cellular proteins possessing a globular domain known as the PDZ domain. As interactions between NS5 and host proteins have been poorly characterized, Giraud et al. [65] investigated interaction between the NS5 PBM domain of WNV and PDZ-proteins, both in vitro and in vivo, and demonstrated that the C-terminal PBM of WNV NS5 recognizes several human PDZ. (iv) Several post-translational modifications of flavivirus NS5—including threonine phosphorylation—could have potential regulatory roles. NS5 phosphorylation is broadly conserved in flaviviruses [66,67]. The DENV NS5 protein is phosphorylated by both mammalian and mosquito protein kinase G at the conserved Thr449 residue. This phosphorylation is essential for successful virus propagation. To analyze the potential role of NS5 markers in the attenuated chimera IS98-NS5/3'UTR, we aligned the sequences of the two parental WNV strains, IS98 and IT08, with that of a representative DENV-2 strain; the virulence of DENV-2 being extensively characterized (Appendix A Figure A1). No differences were noted among the two parental strains and DENV-2 at these positions, suggesting that the attenuated phenotype of IS98-NS5/3'UTR could not be explained by the known molecular markers of virulence in NS5. The NS5 protein also plays a key role in evasion of the host immune response, notably by inhibiting the JAK-STAT pathway and consequently induction of the type I IFN response [68]. Synonymous mutations in this region could therefore affect the mammalian immune response, as has been documented for several flaviviruses including ZIKV, JEV, and DENV. ZIKV NS5 inhibits the phosphorylation of STAT1 and leads to degradation of STAT2, while JEV, DENV, or WNV have been shown to antagonize this pathway too [68]. STAT2 is frequently targeted for NS5-mediated IFN suppression in flaviviruses, and modification in NS5 nucleotide sequence could consequently impact host immune response and lead to more efficient viral infection [69]. IS98-NS5/3'UTR and WNV-IT08 caused reduced mortality in mice at 21 dpi compared with WNV-IS98. It is possible that WNV-IT08 and IS98-NS5/3'UTR present molecular features that failed to inhibit host innate immune responses, especially type-I IFN response, and in this context, the role of non-synonymous NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V, and NS5-R422K mutations could be investigated.

Furthermore, as the IS98-NS5/3'UTR chimera possesses not only the NS5 coding region but also the 3'UTR of WNV-IT08, the attenuated phenotype in mice could be related to modifications in the 3'UTR region. The flavivirus genome is flanked by the 5'UTR and 3'UTR. The 5'UTR is about 100 nt long, whereas the 3'UTR differs in length between flaviviruses, ranging from 400 to 700 nt. Interaction between 5'UTR and 3'UTR is critical for viral RNA replication [70], notably via its recruitment of the NS5 polymerase. Only a single study has addressed the role of the 3'UTR region in WNV host virulence [48]. As the 3'UTR plays a role in viral replication, it would be interesting to address its possible role in the differences observed between parental viruses and chimeras. Moreover, it is possible that the 5'UTR and 3'UTR of the two strains, WNV-IS98 and IT08, are incompatible, which could impair their interaction/cyclization and ultimately perturb viral replication for the IS98-NS5/3'UTR chimera. Sequence alignment of WNV-IS98 and IT08 strains revealed 25 mutations in their 3'UTR. The 3'UTR is highly structured with regions conserved between flaviviruses. It is composed of a stem-loop (SL), two dumbbell (DB) structures, conserved sequences (CS), and repeated conserved sequences (RCS). One of the important nucleotide sequences in the 3'UTR is the 3'-terminal stem-loop (3'SL). This region of the RNA genome of flavivirus includes sequence elements that are required for genome cyclization. Cyclization is a prerequisite for the initiation of viral replication. One part of 3'SL is metastable and confers a structural flexibility that could be implicated in change from linear to circular RNA. Many studies show a role of 3'SL in RNA replication [71]. None of the 25 3'UTR mutations found between WNV-IS98 and IT08 are in 3'SL, suggesting that the difference of viral replication between WNV-IS98 and IT08 could not be explained by a difference in cyclization depending on the 3'SL sequence (Table 1). The 3'UTR sequence has been more extensively investigated for DENV. Manzano et al. created deletions of five nucleotides in the DB sequence [72], showing that viral translation rate was reduced by

60% with a double deletion mutant nt 10,474–10,478/nt 10,562–10,566 in mammalian cells. Sequence alignment of the 3'UTR region of the DENV-2 virus and parental strains, WNV-IS98 and IT08, showed 100% identity in the 10562–10566 sequence between the four viruses (Appendix A Figure A3). However, the 10,474–10,478 region differs by one nucleotide between WNV-IS98 and IT08. Its role in viral translation for Dengue virus could suggest that this region could similarly influence viral translation of WNV-IS98 and IT08 and the corresponding chimeras (Table 1).

We chose to create viral chimeras between two Mediterranean strains, WNV-IS98 and IT08, to identify which molecular regions could be implicated in differences in bird mortality during WNV outbreaks. In an SPF chick model, IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and WNV-IT08 displayed a similarly attenuated behavior, whereas IS98-NS5/3'UTR seemed to be as virulent as WNV-IS98. Our results suggest that the NS4A/NS4B/5'NS5 region, and probably the NS4B-249 residue, could be implicated in decreased virulence of WNV in SPF chicks and possibly in slightly decreased virulence in mice. The NS5-3'UTR region seemed to decrease virulence in mammalian hosts, possibly in relation to modulation of the NS5 polymerase activity or of host innate immunity. Taken together, our results suggest that genome modifications have different effects depending on the nature of the host [73] and provide new molecular determinants candidates in WNV virulence. It is already known that molecular markers of virulence can be host-dependent, as previously illustrated by Puig-Basagotti et al., who showed that the NS4B-E249D mutation modified virulence in mammalian but not in mosquito cell models. This analysis, however, was performed only in vitro. Here we sought to improve understanding of the role of molecular markers in different in vivo hosts. Modifications in the 3' end genomic region could influence protein–protein interactions (PPI) and notably between NS4A/NS4B and NS2A and NS2B, or between NS3 and NS5 proteins [74]. These interactions have also been described for DENV [75] between NS2B/NS3 [76], NS4A/NS4B [77], NS1/NS4B [78], NS3/NS4B [79], and NS3/NS5 [80]. Finally, not only protein–protein, but also viral RNA-protein interactions, could underlie the modification in virulence.

Although our study focused on the 3' end of the WNV genome, it would be interesting to investigate other NS and structural proteins of these two Mediterranean strains, and notably the E-159 residue known to be a virulence marker and presenting a non-synonymous mutation between WNV-IS98 and IT08 [81]. Moreover, only a few studies have addressed WNV virulence in mosquitoes, and WNV infections in mosquitoes would substantially improve our understanding of viral transmission dynamics. Finally, our study provides new insight into genetic markers that may influence the virulence of these two Mediterranean strains in birds and in mammalian hosts.

Table 1. Comparison of known literature data with our results. Possible role of known molecular flaviviruses virulence markers in modifying chimeras IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 and IS98-NS5/3'UTR virulence in avian or mice models.

Genome Sequence	Literature Known Molecular Markers	Role	References	Comparison to Our Study	Conclusion for Our Study
NS4	NS4A-F92L	Increase virulence in birds	[58]	NS4A-92 amino acid is the same between IS98 and IT08 so could not explain any difference in chicks	No role of NS4A-92 amino acid in modulating virulence in chicks
NS4	NS4B-E249G	The substitution of the glutamic acid at position 249 (E249) was shown to be crucial for conferring an attenuated phenotype in mice and it was identified in an attenuated strain isolated from birds in 2003 in Texas	[60,61]	RNA quantity in oral swab if IT08 and IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 are significantly lower than IS98 and IS98-NS5/3'UTR at 7 days p.i. → suggesting a role of NS4A/NS4B/5'NS5 in reduced virulence in birds IT08 possesses NS4B-D249 and IS98 possesses E249	Possible role of NS4B-E249D mutation in IT08 or chimera IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 in attenuated virulence in chicks

Table 1. Cont.

Genome Sequence	Literature Known Molecular Markers	Role	References	Comparison to Our Study	Conclusion for Our Study
NS5	K-D-K-E motif (NS5-K61-D146-K182-E218)	Candidate for DENV vaccine	[57,63]	No difference in K-D-K-E motif between IS98 and IT08 (Appendix A Figure A1)	Known molecular markers of virulence of DENV-2, a flavivirus closely related to WNV, cannot, by extension, explain differences observed between WNV IS98 and IT08 and corresponding chimeras
NS5	NS5-R325A, NS5-R519A, NS5-R769A, NS5-K840A, NS5-R841A	High RNA synthesis activity in vitro but delayed or impaired replication in vivo	[64]	Sequence alignment between DENV-2 and our parental strain does not show any difference between IS98 and IT08 (Appendix A Figure A1) 100% identity between IS98/IT08 at these sites and DENV-2 virus, confirming their potential role in flavivirus replication	Known molecular markers of virulence of DENV-2, a flavivirus closely related to WNV, cannot, by extension, explain differences observed between WNV IS98 and IT08 and corresponding chimeras
NS5	PBM motif (three amino acids, T-V-L), just upstream the codon stops	C-term PBM of WNV NS5 recognizes several human PDZ PBM is known to be implicated in virulence	[65]	Sequence alignment of IS98 and IT08 does not show any difference in PBM motif (Appendix A Figure A1)	Known molecular markers of virulence of DENV-2, a flavivirus closely related to WNV, cannot, by extension, explain differences observed between WNV IS98 and IT08 and corresponding chimeras
NS5	Threonine phosphorylation (Thr449)	Regulatory roles	[66,67]	Sequence alignment of IS98 and IT08 does not show any differences in PBM motif (Appendix A Figure A2)	Known molecular markers of virulence of DENV-2, a flavivirus closely related to WNV, cannot, by extension, explain differences observed between WNV IS98 and IT08 and corresponding chimeras
NS5	General modifications in NS5	NS5 protein is known to frequently use multiple strategies to suppress the JAK-STAT signaling pathway and consequently type I IFN response to mammalian NS5. ZIKV inhibits the phosphorylation of STAT1 and leads to degradation of STAT2; JEV, DENV, and WNV antagonize this pathway too STAT2 is frequently targeted for NS5-mediated IFN suppression in flaviviruses, so modifications in NS5 could impact host immune response to viral infection	[69]	IS98-NS5/3'UTR and IT08 engender reduced mortality in mice at 12 days p.i. compared to IS98 It is possible that IT08 and IS98-NS5/3'UTR present molecular features that could not inhibit host innate response	Possible role of NS5 in decreased virulence of IT08 in a mammalian model, maybe by influencing host IFN response

Table 1. Cont.

Genome Sequence	Literature Known Molecular Markers	Role	References	Comparison to Our Study	Conclusion for Our Study
3'UTR	3'-terminal stem-loop (3'SL)	Interaction between 5' UTR and 3' UTR is implied in viral RNA replication. This interaction is important for NS5 polymerase recruitment. Role of 3'SL in viral replication of DENV	[71]	None of the 25 3'UTR mutations found between IS98 and IT08 are in 3'SL, suggesting that the difference of viral replication between IS98 and IT08 could not be explained by a difference in cyclization depending on 3'SL sequence	No role of 3'SL sequence in attenuation of virulence of IT08 or IS98-NS5/3'UTR in a mammalian model
3'UTR	Double deletion mutant nt 10,474–10,478/nt 10562–10566 in DENV	Viral translation rate was reduced by 60% in mammalian cells	[72]	Sequence alignment of 3'UTR region of DENV-2 virus and parental strain, IS98 and IT08 show 100% identity in the 10562–10566 sequence between the four viruses (Appendix A Figure A3) However, 10,474–10,478 differs in one nucleotide between IS98 and IT08. Nucleotide 10,478 of IT08 is the same as DENV-2 (nt T), whereas it is different in IS98 (nt C). That could impact viral translation	Possible role of nucleotide 10,478 in reduced virulence of IT08 and IS98-NS5/3'UTR in a mammalian model

Author Contributions: Conceptualization, S.L. (Sylvie Lecollinet); methodology, C.B., N.P., B.L., M.D. (Maha Dridi), G.G. and S.L. (Sylvie Lecollinet); validation, L.F., S.L. (Steeve Lowenski), G.G. and S.L. (Sylvie Lecollinet); formal analysis, L.F., S.L. (Steeve Lowenski), C.B. and S.L. (Sylvie Lecollinet); investigation, L.F., S.L. (Steeve Lowenski), and M.D. (Marine Dumarest); resources, B.L. and S.L. (Sylvie Lecollinet); data curation, L.F.; writing—original draft preparation, L.F., G.G. and S.L. (Sylvie Lecollinet); writing—review and editing, B.L., M.D. (Maha Dridi), E.A., J.R., S.Z., M.-Á.J.-C., N.P., G.G. and S.L. (Sylvie Lecollinet); visualization, S.L. (Steeve Lowenski) and G.G.; supervision, S.L. (Sylvie Lecollinet); project administration, S.L. (Sylvie Lecollinet); funding acquisition, S.L. (Sylvie Lecollinet). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Commission (HEALTH.2020.2.3-3-3 261391 EuroWestNile project and through DG SANTé (EU-RL on equine diseases)).

Institutional Review Board Statement: Animal experiments on mice and SPF chicks were approved by the joint Anses-UPEC-Alfort Veterinary School ethic committee (permit number: 15/02/11–13) and Bioethics Committee CODA- IPS (agreement number: LA1230174), respectively.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data obtained during this study can be obtained by contacting the authors.

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

Appendix A

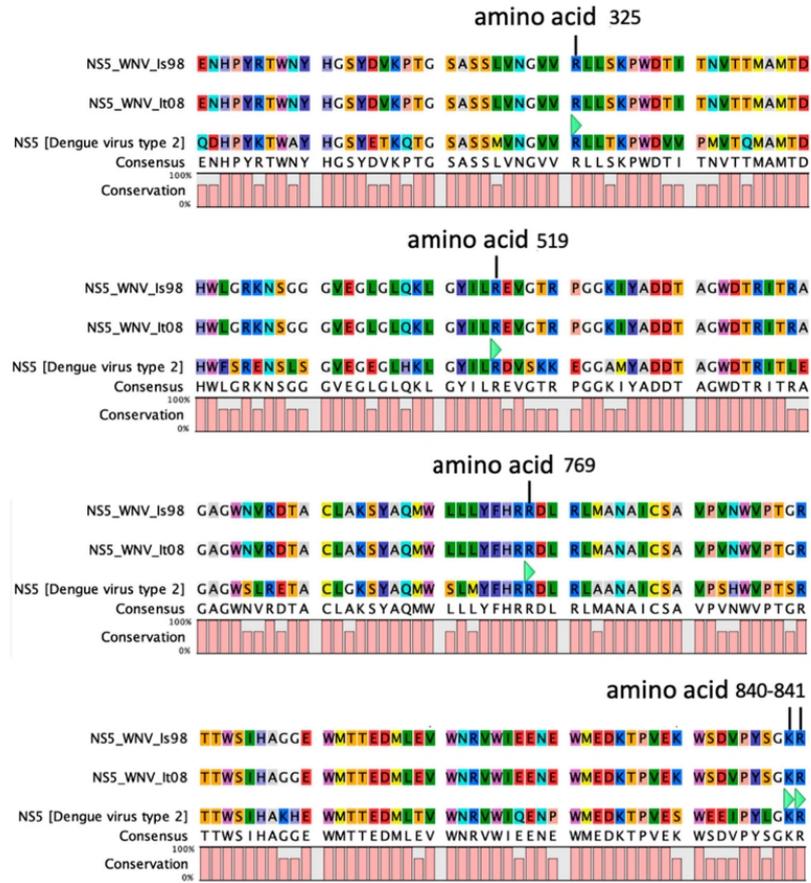


Figure A1. Sequence alignment of NS5 protein: WNV Is98, WNV It08, DENV-2 (NC_001474.2).

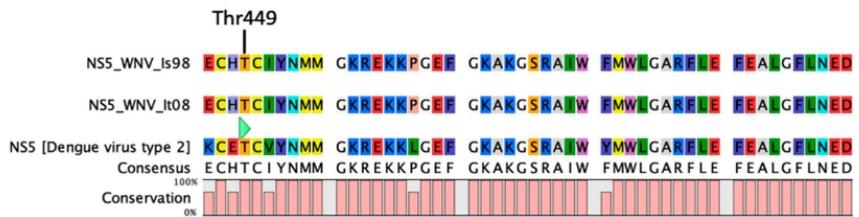


Figure A2. Sequence alignment of NS5 protein: WNV Is98, WNV It08, DENV-2 (NC_001474.2), at Thr 449 phosphorylation site.

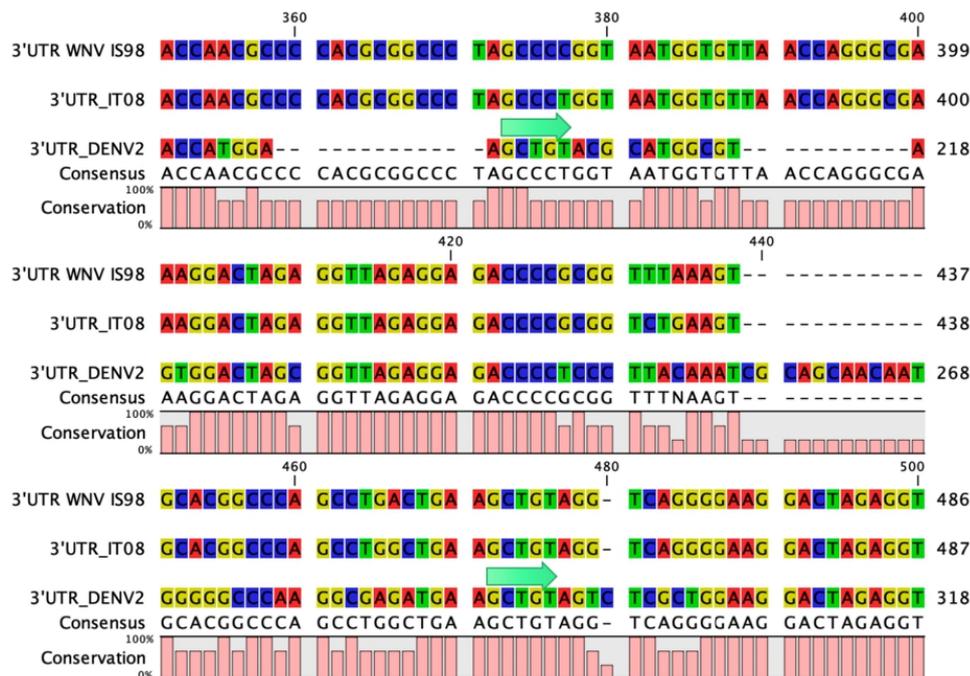


Figure A3. Sequence alignment of 3' UTR: WNV Is98, WNV It08, DENV-2 (NC_001474.2).

References

- Smithburn, K.; Hugues, T.; Burke, A.; Paul, J. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1-20*, 471. [\[CrossRef\]](#)
- Suthar, M.S.; Diamond, M.S.; Gale, M. West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *2*, 115–128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hubálek, Z.; Halouzka, J. West Nile Fever—A Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 643–650. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sejvar, J.J.; Haddad, M.B.; Tierney, B.C.; Campbell, G.L.; Marfin, A.A.; Van Gerpen, J.A.; Fleischauer, A.; Leis, A.A.; Stokic, D.S.; Petersen, L.R. Neurologic Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection. *JAMA* **2003**, *290*, 511–515. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kramer, L.D.; Li, J.; Shi, P.Y. West Nile virus. *Lancet Neurol.* **2007**, *6*, 171–181. [\[CrossRef\]](#)
- Pealer, L.N.; Marfin, A.A.; Petersen, L.R.; Lanciotti, R.S.; Page, P.L.; Stramer, S.L.; Chamberland, M.E. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1236–1245. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Petersen, L.R. Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. *J. Med. Entomol.* **2019**, *56*, 1456–1462. [\[CrossRef\]](#)
- Iwamoto, M.; Jernigan, D.B.; Guasch, A.; Trepka, M.J.; Blackmore, C.G.; Hellinger, W.C.; Petersen, L.R. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *22*, 2196–2203. [\[CrossRef\]](#)
- Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Petrovic, T.; Toplak, I.; Barbic, L.; Petric, D.; Savini, G. Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 437. [\[CrossRef\]](#)
- Brustolin, M.; Talavera, S.; Santamaría, C.; Rivas, R.; Pujol, N.; Aranda, C.; Busquets, N. *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) populations as vectors for lineage 1 and 2 West Nile virus in Europe. *Med. Vet. Entomol.* **2016**, *30*, 166–173. [\[CrossRef\]](#)
- Komar, N.; Langevin, S.; Hinten, S. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 311–322. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hayes, E.B.; Komar, N.; Nasci, R.S.; Montgomery, S.P.; O'Leary, D.R.; Campbell, G.L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1167–1173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sejvar, J.J.; Leis, A.A.; Stokic, D.S.; Van Gerpen, J.A.; Marfin, A.A.; Webb, R.; Petersen, L.R. Acute Flaccid Paralysis and West Nile Virus Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 788–793. [\[CrossRef\]](#)
- Briese, T.; Jia, X.Y.; Huang, C.; Grady, L.J.; Lipkin, W.I. Identification of a Kunjin/West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet* **1999**, *354*, 1261–1262. [\[CrossRef\]](#)

15. Lanciotti, R.; Roehrig, J.; Deubel, V.; Smith, J. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science* **1999**, *286*, 2333–2337. [[CrossRef](#)]
16. Jia, X.Y.; Briese, T.; Jordan, I.; Rambaut, A.; Chi, H.C.; Mackenzie, J.S.; Lipkin, W.I. Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* **1999**, *354*, 1971–1972. [[CrossRef](#)]
17. Ronca, S.E.; Murray, K.O.; Nolan, M.S. Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999–2016. *Emerg Infect Dis.* **2019**, *25*, 325–327. [[CrossRef](#)]
18. Barrett, A.D.T. West Nile in Europe: An increasing public health problem. *J. Travel. Med.* **2018**, *25*, tay096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Barzon, L.; Montarsi, F.; Quaranta, E.; Monne, I.; Pacenti, M.; Michelutti, A.; Capelli, G. Early start of seasonal transmission and co-circulation of West Nile virus lineage 2 and a newly introduced lineage 1 strain, northern Italy, June 2022. *Euro Surveill.* **2022**, *27*, 2200548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Shlomit, P.; Jan, C.S. Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia—A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3534–3562.
21. Brown, H.E.; Childs, J.E.; Diuk-Wasser, M.A.; Fish, D. Ecologic Factors Associated with West Nile Virus Transmission, Northeastern United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1539–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Marcantonio, M.; Rizzoli, A.; Metz, M.; Rosà, R.; Marini, G.; Chadwick, E.; Neteler, M. Identifying the environmental conditions favouring West Nile Virus outbreaks in Europe. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kaiser, J.A.; Wang, T.; Barrett, A.D. Virulence determinants of West Nile virus: How can these be used for vaccine design? *Future Virol.* **2017**, *12*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Martin, J.E.; Pierson, T.C.; Hubka, S.; Gordon, I.J.; Enama, M.E.; Vaccine Research Center 302 Study Team. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 1732–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Durbin, A.P.; Wright, P.F.; Cox, A.; Kagucia, W.; Elwood, D.; Henderson, S.; Pletnev, A.G. The live attenuated chimeric vaccine rWN/DEN4Δ30 is well-tolerated and immunogenic in healthy flavivirus-naïve adult volunteers. *Vaccine* **2013**, *31*, 5772–5777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Woods, C.W.; Sanchez, A.M.; Swamy, G.K.; McClain, M.T.; Harrington, L.; Freeman, D.; Walter, E.B. An observer blinded, randomized, placebo-controlled, phase I dose escalation trial to evaluate the safety and immunogenicity of an inactivated West Nile virus Vaccine, HydroVax-001, in healthy adults. *Vaccine* **2019**, *37*, 4222–4230. [[CrossRef](#)]
27. Orlinger, K.K.; Holzer, G.W.; Schwaiger, J.; Mayrhofer, J.; Schmid, K.; Kistner, O.; Falkner, F.G. An inactivated West Nile Virus vaccine derived from a chemically synthesized cDNA system. *Vaccine* **2010**, *28*, 3318–3324. [[CrossRef](#)]
28. Monath, T.P.; Liu, J.; Kanesa-Thanan, N.; Myers, G.A.; Nichols, R.; Deary, A.; Bedford, P. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 6694–6699. [[CrossRef](#)]
29. Biedenbender, R.; Bevilacqua, J.; Gregg, A.M.; Watson, M.; Dayan, G. Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Investigate the Immunogenicity and Safety of a West Nile Virus Vaccine in Healthy Adults. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 75–84. [[CrossRef](#)]
30. Dayan, G.H.; Bevilacqua, J.; Coleman, D.; Buldo, A.; Risi, G. Phase II, dose ranging study of the safety and immunogenicity of single dose West Nile vaccine in healthy adults ≥ 50 years of age. *Vaccine* **2012**, *30*, 6656–6664. [[CrossRef](#)]
31. Fiacre, L.; Pagès, N.; Albina, E.; Richardson, J.; Lecollinet, S.; Gonzalez, G. Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9117. [[CrossRef](#)]
32. Audsley, M.; Edmonds, J.; Liu, W.; Mokhonov, V.; Mokhonova, E.; Melian, E.B.; Khromykh, A.A. Virulence determinants between New York 99 and Kunjin strains of West Nile virus. *Virology* **2011**, *414*, 63–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Shirato, K.; Miyoshi, H.; Goto, A.; Ako, Y.; Ueki, T.; Kariwa, H.; Takashima, I. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3637–3645. [[CrossRef](#)]
34. Malkinson, M.; Banet, C.; Weisman, Y.; Pokamunski, S.; King, R.; Deubel, V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 392–397. [[CrossRef](#)]
35. Bin, H.; Grossman, Z.; Pokamunski, S.; Malkinson, M.; Weiss, L.; Duvdevani, P.; Mendelson, E. West Nile fever in Israel 1999–2000: From geese to humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *951*, 127–142. [[CrossRef](#)]
36. Dridi, M.; Rauw, F.; Muylkens, B.; Lecollinet, S.; van den Berg, T.; Lambrecht, B. Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60*, 51–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Shiryaev, S.A.; Chernov, A.V.; Aleshin, A.E.; Shiryaeva, T.N.; Strongin, A.Y. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2081–2085. [[CrossRef](#)]
38. Ambrose, R.L.; Mackenzie, J.M. A Conserved Peptide in West Nile Virus NS4A Protein Contributes to Proteolytic Processing and Is Essential for Replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 11274–11282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Evans, J.D.; Seeger, C. Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J. Virol.* **2007**, *81*, 11809–11816. [[CrossRef](#)]
40. Wicker, J.A.; Whiteman, M.C.; Beasley, D.W.; Davis, C.T.; McGee, C.E.; Lee, J.C.; Barrett, A.D. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology* **2012**, *426*, 22–33. [[CrossRef](#)]
41. Wicker, J.A.; Whiteman, M.C.; Beasley, D.W.; Davis, C.T.; Zhang, S.; Schneider, B.S.; Barrett, A.D. A single amino acid substitution in the central portion of the West Nile virus NS4B protein confers a highly attenuated phenotype in mice. *Virology* **2006**, *349*, 245–253. [[CrossRef](#)]

42. Andrade, C.C.; Maharaj, P.D.; Reisen, W.K.; Brault, A.C. North American West Nile virus genotype isolates demonstrate differential replicative capacities in response to temperature. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2523–2533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Van Slyke, G.A.; Jia, Y.; Whiteman, M.C.; Wicker, J.A.; Barrett, A.D.T.; Kramer, L.D. Vertebrate attenuated West Nile virus mutants have differing effects on vector competence in *Culex tarsalis* mosquitoes. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 1069–1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tian, J.N.; Wu, R.H.; Chen, S.L.; Chen, C.T.; Yueh, A. Mutagenesis of the dengue virus NS4A protein reveals a novel cytosolic N-terminal domain responsible for virus-induced cytopathic effects and intramolecular interactions within the N-terminus of NS4A. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 457–470. [[CrossRef](#)]
45. Li, X.D.; Li, X.F.; Ye, H.Q.; Deng, C.L.; Ye, Q.; Shan, C.; Zhang, B. Recovery of a chemically synthesized Japanese encephalitis virus reveals two critical adaptive mutations in NS2B and NS4A. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95*, 806–815. [[CrossRef](#)]
46. Collins, N.D.; Beck, A.S.; Widen, S.G.; Wood, T.G.; Higgs, S.; Barrett, A.D.T. Structural and Nonstructural Genes Contribute to the Genetic Diversity of RNA Viruses. *MBio* **2018**, *9*, e01871-18. [[CrossRef](#)]
47. Kaiser, J.A.; Luo, H.; Widen, S.G.; Wood, T.G.; Huang, C.Y.; Wang, T.; Barrett, A.D. Genotypic and phenotypic characterization of West Nile virus NS5 methyltransferase mutants. *Vaccine* **2019**, *37*, 7155–7164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Davis, C.T.; Galbraith, S.E.; Zhang, S.; Whiteman, M.C.; Li, L.; Kinney, R.M.; Barrett, A.D. A Combination of Naturally Occurring Mutations in North American West Nile Virus Nonstructural Protein Genes and in the 3' Untranslated Region Alters Virus Phenotype. *J. Virol.* **2007**, *81*, 6111–6116. [[CrossRef](#)]
49. Bahuon, C.; Despres, P.; Pardigon, N.; Panthier, J.J.; Cordonnier, N.; Lowenski, S.; Lecollinet, S. IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47666. [[CrossRef](#)]
50. Linke, S.; Ellerbrok, H.; Niedrig, M.; Nitsche, A.; Pauli, G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **2007**, *146*, 355–358. [[CrossRef](#)]
51. Toussaint, J.F.; Sailleau, C.; Breard, E.; Zientara, S.; De Clercq, K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* **2007**, *140*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* **1938**, *27*, 493–497. [[CrossRef](#)]
53. Jaimipak, T.; Yoksan, S.; Ubol, S.; Pulmanusahakul, R. Small plaque size variant of chikungunya primary isolate showed reduced virulence in mice. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2018**, *36*, 201–205. [[PubMed](#)]
54. Dalrymple, N.A.; Cimica, V.; Mackow, E.R. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* **2015**, *6*, e00553-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Munoz-Jordán, J.L.; Laurent-Rolle, M.; Ashour, J.; Martínez-Sobrido, L.; Ashok, M.; Lipkin, W.I.; García-Sastre, A. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *J. Virol.* **2005**, *79*, 8004–8013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Knyazhanskaya, E.; Morais, M.C.; Choi, K.H. Flavivirus enzymes and their inhibitors. *Enzymes* **2021**, *49*, 265–303. [[PubMed](#)]
57. Züst, R.; Li, S.H.; Xie, X.; Velumani, S.; Chng, M.; Toh, Y.X.; Fink, K. Characterization of a candidate tetravalent vaccine based on 2'-O-methyltransferase mutants. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0189262. [[CrossRef](#)]
58. Kinney, R.M.; Huang, C.Y.H.; Whiteman, M.C. Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 3611–3622. [[CrossRef](#)]
59. Lim, S.P.; Noble, C.G.; Shi, P.Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antivir. Res.* **2015**, *119*, 57–67. [[CrossRef](#)]
60. Davis, C.T.; Beasley, D.W.; Guzman, H.; Siirin, M.; Parsons, R.E.; Tesh, R.B.; Barrett, A.D. Emergence of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology* **2004**, *330*, 342–350. [[CrossRef](#)]
61. Puig-Basagoiti, F.; Tilgner, M.; Bennett, C.J.; Zhou, Y.; Muñoz-Jordán, J.L.; García-Sastre, A.; Shi, P.Y. A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* **2007**, *361*, 229–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Klema, V.J.; Padmanabhan, R.; Choi, K.H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* **2015**, *7*, 4640–4656. [[CrossRef](#)]
63. Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Li, H. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3891–3903. [[CrossRef](#)]
64. Iglesias, N.G.; Filomatori, C.V.; Gamarnik, A.V. The F1 Motif of Dengue Virus Polymerase NS5 Is Involved in Promoter-Dependent RNA Synthesis. *J. Virol.* **2011**, *85*, 5745–5756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Giraud, E.; Del Val, C.O.; Caillet-Saguy, C.; Zehrouni, N.; Khou, C.; Caillet, J.; Wolff, N. Role of PDZ-binding motif from West Nile virus NS5 protein on viral replication. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3266. [[CrossRef](#)]
66. Morozova, O.V.; Tsekhanovskaya, N.A.; Maksimova, T.G.; Bachvalova, V.N.; Matveeva, V.A.; Kit, Y.; Ya, N. Phosphorylation of tick-borne encephalitis virus NS5 protein. *Virus Res.* **1997**, *49*, 9–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Reed, K.E.; Gorbalenya, A.E.; Rice, C.M. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **1998**, *72*, 6199–6206. [[CrossRef](#)]
68. Best, S.M. The Many Faces of the Flavivirus NS5 Protein in Antagonism of Type I Interferon Signaling. *J. Virol.* **2017**, *91*, e01970-16. [[CrossRef](#)]
69. Thurmond, S.; Wang, B.; Song, J.; Hai, R. Suppression of Type I Interferon Signaling by Flavivirus NS5. *Viruses* **2018**, *10*, E712. [[CrossRef](#)]

70. Yong, X.E.; Raghuvamsi, P.V.; Anand, G.S.; Wohland, T.; Sharma, K.K. Dengue virus strain 2 capsid protein switches the annealing pathway and reduces intrinsic dynamics of the conserved 5' untranslated region. *RNA Biol.* **2021**, *18*, 718–731. [[CrossRef](#)]
71. Meyer, A.; Freier, M.; Schmidt, T.; Rostowski, K.; Zwock, J.; Lilie, H.; Friedrich, S. An RNA Thermometer Activity of the West Nile Virus Genomic 3'-Terminal Stem-Loop Element Modulates Viral Replication Efficiency during Host Switching. *Viruses* **2020**, *12*, E104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Manzano, M.; Reichert, E.D.; Polo, S.; Falgout, B.; Kasprzak, W.; Shapiro, B.A.; Padmanabhan, R. Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 22521–22534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Diamond, M.S. Virus and host determinants of West Nile virus pathogenesis. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Yu, L.; Takeda, K.; Markoff, L. Protein-protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells. *Virology* **2013**, *446*, 365–377. [[CrossRef](#)]
75. Tay, M.Y.F.; Vasudevan, S.G. The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1062*, 147–163.
76. Phong, W.Y.; Moreland, N.J.; Lim, S.P.; Wen, D.; Paradkar, P.N.; Vasudevan, S.G. Dengue protease activity: The structural integrity and interaction of NS2B with NS3 protease and its potential as a drug target. *Biosci. Rep.* **2011**, *31*, 399–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Zou, J.; Xie, X.; Wang, Q.Y.; Dong, H.; Lee, M.Y.; Kang, C.; Shi, P.Y. Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. *J. Virol.* **2015**, *89*, 3455–3470. [[CrossRef](#)]
78. Zou, J.; Xie, X.; Lee, L.T.; Chandrasekaran, R.; Reynaud, A.; Yap, L.; Shi, P.Y. Dimerization of flavivirus NS4B protein. *J. Virol.* **2014**, *88*, 3379–3391. [[CrossRef](#)]
79. Umareddy, I.; Chao, A.; Sampath, A.; Gu, F.; Vasudevan, S.G. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 2605–2614. [[CrossRef](#)]
80. Kapoor, M.; Zhang, L.; Ramachandra, M.; Kusukawa, J.; Ebner, K.E.; Padmanabhan, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19100–19106. [[CrossRef](#)]
81. Alsaleh, K.; Khou, C.; Frenkiel, M.P.; Lecollinet, S.; Vazquez, A.; de Arellano, E.R.; Pardigon, N. The E glycoprotein plays an essential role in the high pathogenicity of European-Mediterranean IS98 strain of West Nile virus. *Virology* **2016**, *492*, 53–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

1.2. Discussion de la partie 1

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les déterminants moléculaires impliqués dans les différences de virulence observées entre les souches virales West Nile Israël 1998 et Italie 2008. La comparaison des différentes substitutions génomiques entre les deux souches tend à montrer que la plupart des modifications observées entre les deux souches se situent à la fin du génome, notamment sur la région génomique codant pour la protéine NS5 (104 substitutions). De plus, peu de données sont disponibles sur le rôle de la région 3'UTR dans la virulence des différentes souches. C'est pour ces raisons que nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur la fin du génome du VWN, en ciblant les protéines NS4A/NS4B et les premiers nucléotides de la protéine NS5 ainsi que sur la protéine NS5 et les premiers nucléotides de la région 3'UTR. Les propriétés biologiques des différentes constructions ont été évaluées *in vitro* et *in vivo* en s'intéressant uniquement aux hôtes mammifères (cellule Vero, souris BALB/cByJ) et aux hôtes aviaires (cellules CCL141, poulet SPF).

Les résultats *in vivo* obtenus lors d'infection de poulet SPF de 1 jour, montrent un rôle des protéines NS4A/NS4B et les premiers nucléotides de la protéine NS5 dans l'atténuation de la souche Italie 2008. L'analyse montre non seulement une diminution significative ($p < 0,05$) de l'excrétion du virus pour la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 dans les écouvillons oraux 7 jours après infection mais également une baisse significative de la mortalité en comparaison avec la souche Israël 1998. De plus, la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 et le virus parental Italie 2008 présentent des comportements similaires que ce soit au niveau de l'excrétion orale ou en termes de mortalité post-infection. L'ensemble de ces résultats place les régions NS4A/NS4B/5'NS5, et notamment la mutation NS4B-E249G, comme des éléments potentiellement importants dans la réplication et la virulence du VWN chez l'oiseau.

L'analyse *in vitro* sur un modèle mammifère suggère une atténuation de la chimère IS98-NS5/3'UTR notamment par la formation de plages de lyses plus petites lors d'infection de cellules Vero. De plus, l'infection de souris BALB/cByJ, hautement sensibles à l'infection par le VWN, a permis de mettre en avant un pic de virémie significativement plus faible pour cette chimère, par rapport au virus parental Israël 1998. Ces différences ont été confortées lors de l'étude de la mortalité 21 jours post infection, montrant une tendance de la souche parentale virulente à entraîner plus de mortalité que la chimère IS98-NS5/3'UTR (100% et 40% de mortalité respectivement).

La comparaison des séquences parentales WNV Israël 1998 et WNV-Italie 2008, a permis de mettre en évidence la présence de la mutation NS4B-E249G, présente dans la souche Italie 2008 ainsi que dans la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5. Cette mutation, présente également dans une souche atténuée chez l'oiseau au Texas en 2003 (Davis et al. 2004), pourrait être une bonne candidate expliquant les effets observés dans notre modèle poulet SPF. En modèle mammifère, la mutation NS4B-E249G ne semble pas avoir d'impact sur la virulence des souches.

D'autres mutations non-synonymes présentes sur la région codant pour la protéine NS5 pourraient jouer un rôle dans les résultats obtenus lors d'infection de souris, notamment NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A732V ou NS5-R442K. Toutefois, aucune modification dans des zones importantes pour la réplication virale, décrites dans la littérature, telles que le motif K-D-K-E, les acides aminés présents en positions 325 ; 519 ; 769 ; 840 ; ou 841, le motif PBM ou encore la phosphorylation de la thréonine 449 n'a été identifiée entre les deux souches parentales, ne permettant pas de les impliquer dans les différences de virulence observées.

Cette étude nous a permis de mettre en avant un rôle différent des régions génomiques localisées en 3' du génome viral West Nile dans la réplication et la virulence de ce dernier chez les mammifères et les oiseaux. La région génomique NS4A/NS4B/5'NS5 est impliquée dans l'atténuation de la virulence chez l'oiseau alors que la région génomique NS5/3'UTR semble plutôt impliquée dans une diminution de la virulence en modèle mammifère.

Pour compléter la compréhension du cycle de transmission du VWN, il manquait à cette première étude, l'analyse de la compétence vectorielle des souches parentales IS98 et IT08 en comparaison à celle des virus chimériques générés. Notre revue de la littérature (Fiacre et al. 2020) identifie ce manque de connaissance comme critique dans l'obtention d'une vision intégrée de la virulence et de la transmission de certains isolats.

Il nous manquait également l'étude du rôle des autres protéines non-structurales et des 3 protéines structurales dans la virulence accrue de WNV-IS98 chez les hôtes vertébrés et invertébrés.

Sur ces deux points, nous apportons de nouvelles informations dans la seconde partie de la thèse.

2. Introduction de la partie 2

Afin de compléter la liste des déterminismes moléculaires de la virulence entre les isolats méditerranéen (WNV-IS98) et européen (WNV-IT08), en fonction de l'hôte considéré, nous avons généré des chimères couvrant l'ensemble du génome WN en utilisant une méthode innovante plus efficace de génétique inverse, la méthode ISA (*Infectious Subgenomics Amplicons*), plus rapide que les méthodes précédentes (Aubry et al. 2014). La transmissibilité de ces dernières par les moustiques *Culex* et de ce fait, l'étude de la compétence des vecteurs a également été abordée dans ce chapitre.

Le système de génétique inverse le plus communément utilisé correspond au clone infectieux. Malgré de nombreuses avancées technologiques simplifiant sa construction et son utilisation, cet outil reste encore difficile à manipuler, en particulier en raison de l'instabilité et de la toxicité de certaines séquences virales au sein des bactéries. Afin de palier à cet inconvénient, plusieurs systèmes « bacteria-free » dont la méthode ISA ont été développés et appliqués à plusieurs virus (Aubry et al. 2014).

L'implication des protéines structurales et notamment certains motifs particuliers liés à celles-ci comme la glycosylation de la protéine E (Beasley et al. 2005) est largement connu comme impactant la virulence, ainsi que la neuroinvasion du VWN.

Nous avons donc choisi de concentrer nos efforts sur l'étude individuelle des protéines non-structurales ainsi que la région non-codante 3'UTR, en interchangeant chacune des régions génomiques d'IS98 par son homologue d'IT08. Au total, six chimères utilisant le « squelette » de WNV-IS98 ont été obtenues, à savoir IS98-3'UTR, IS98-3'NS4B/NS5, IS983'NS2B/NS3/NS4A/NS4B, IS98-NS2A/NS2B, IS98-NS1, IS98-5'UTR/C/prM/E. Les chimères homologues IT08-IS98 ont été générées en parallèle mais n'ont pas été analysées dans le cadre de ces travaux.

La capacité répliquative des six chimères a été étudiée *in vitro* sur cellules de mammifères (cellules Vero) et de moustiques (cellules C6/36) et nous a permis de sélectionner les chimères d'intérêt à investiguer *in vivo* en termes de pathogénicité lors de l'infection de souris BALB/cByJ et en termes de dissémination/transmissibilité suite au gorgement de *Culex pipiens*.

Ce chapitre nous a permis de mettre en lumière de nouvelles régions génomiques impliquées dans la neuro-pathogénicité de WNV-IS98 et dans la transmissibilité améliorée de cet isolat. Ces régions génomiques constituent donc de potentielles cibles pour l'établissement de nouvelles stratégies vaccinales et pour anticiper de futures épidémies/épizooties.

2.1. Partie 2: ARTICLE 2: Molecular markers present in the end of genome of two Mediterranean Basin West Nile virus strains, implicated in mammalian BALB/cByJ host virulence and *Culex pipiens* vector competence

Article en cours de relecture par les différents co-auteurs.

Molecular markers present in two Mediterranean Basin West Nile virus strains, implicated in mammalian BALB/cByJ host virulence and *Culex pipiens* vector competence

Lise Fiacre^{1,2}, Antoine Nougairède³, Camille Migné¹, Maëlle Bayet², Marine Dumarest¹, Teheipuaura Helle¹, Antoni Exbrayat⁴, Nonito Pagès², Damien Vitour¹, Anna-Bella Failloux⁵, Marie Vazeille⁵, Emmanuel Albina⁴, Sylvie Lecollinet², Gaëlle Gonzalez¹

¹UMR ANSES, ENVA, INRAE Virologie, Laboratoire de santé animale, Maisons-Alfort, France

²CIRAD, UME ASTRE, Petit-Bourg, Guadeloupe

³Unité des Virus Emergents UMR190, Université de la Méditerranée, Marseille, France

⁴ASTRE, CIRAD, INRAE, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁵Institut Pasteur, Arbovirus et Insectes Vecteurs, Département de Virologie, Paris, France

Abstract

West Nile virus (WNV) is a single strand positive sense RNA virus (+ssRNA) belonging to the genus *Flavivirus*. It was first discovered in 1934 in Uganda, and since 1999 has been responsible for many outbreaks, in wild birds, horses or humans, in most continents, including America, Europe and Africa in the first place. Worldwide spread, as well as outbreak severity can be influenced by many ecological factors, like host availability, biodiversity and competence, temperature, mosquito distribution and vector competence, and genomic virulence factors. Former studies have investigated WNV factors of virulence, but few have analysed virus genetic determinants of pathogenicity in different species, and even less studies have considered investigating the genetic drivers of *Culex* vector competence *in vivo*. In this study, we characterized WNV genetic modifications implicated in the difference of virulence observed in two strains from the Mediterranean Basin, the first one isolated during a significant outbreak in Israel in 1998, and the other from a less important outbreak occurring in Italy in 2008. We used the innovative and powerful reverse genetic ISA tool (*Infectious subgenomics Amplicons*) to generate chimeras between the two strains, focusing on non-structural proteins and 3'UTR non-coding region. We analyzed the replication of these chimeras and their progenitors in mammals, BALB/cByJ mice and vector competence in *Culex pipiens*. *In vivo* results on BALB/cByJ mice, suggests a role of NS2B/NS3/NS4B/NS5 in virus attenuation in mammals, while NS4B/NS5/3'UTR regions are critical in *Culex pipiens* infection and possibly in vector competence.

Keywords: West Nile virus, Mediterranean basin, reverse genetic, *Culex pipiens*, host virulence, vector competence.

1. Introduction

West Nile virus (WNV) is a mosquito-borne single stranded, positive sense RNA virus. It belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. It is transmitted through an enzootic cycle involving birds as amplifying hosts and mosquitoes as vectors with occasional spillovers to mammals like humans and horses considered as dead-end host [1]. It was first isolated from a native woman of Uganda in 1934 [2]. WNV was first detected in Israel in 1951 [3], during which a high seroprevalence rate of the population was demonstrated [4]. Silent or paucisymptomatic infections lasted for 30 years before important human outbreaks and horse epizootics were first reported in Europe, in Romania, Italy and Russia in 1996, 1998 and 1999 respectively and before the major emergence of WNV in 1999 in the USA [5]. Since

the 1990's, WNV actively circulated in the Mediterranean basin on many occasions [6]. Many outbreaks occurred in Morocco in 1996, 2003 [7] or 2010 [8], affecting mainly horses, due to the transmission of the virus by *Culex pipiens* mosquitoes [9], [10], [11]. WNV was also responsible for human meningoencephalitis cases in Algeria, in 1994 (50 cases, 8 fatalities), or in Tunisia in 1997 (111 cases, 5 fatalities) [12]. WNV lineage 1 (re)emerged in Israel in 1998 related to a highly virulent strain isolated from the brain of dead storks [13], with 35 and up to 428 human neuroinvasive cases reported in 1998 and in 2000 respectively [14]. The year after, a high WNV-IgG seroprevalence rate was reported in Israel in horses and geese sera [15]. France reported in 1962 for the first time West Nile virus circulation in the Camargue region [16], located in the South-East part of the country close to the Mediterranean sea, with around 80 infected horses presenting neurological signs ; virus was mainly transmitted by *Culex modestus Ficalbi* at those times [17]. Many years have passed before the re-emergence of WNV lineage 1 in France in 2000 [18]. Since then, WNV circulation has been regularly evidenced in the South of France [19], [20] and interestingly, WNV has been identified for the first time from *Culex pipiens* mosquitoes during the 2015 WNV outbreaks in the Camargue area. WNV has been (re)emerging throughout Europe for decades inducing unpredictable outbreaks of varying intensity in equine, human and avian populations with high records of WNV human and horse meningoencephalitis cases especially in 2018 [21] and 2022 [22].

Bird migrations are mainly involved in long-distance transmission and spread of the virus [23]. Due to its ability to rapidly adapt to local environmental conditions, WNV spread and emerged all around the world. Its circulation has been evidenced in all continents with the exception of Antarctica. Intense and recurrent WNV outbreaks of meningitis and encephalitis in birds, horses and humans have been reported in America, Africa or Europe. Although the majority of infected people remain asymptomatic (80%), a small proportion will develop flu-like symptoms (20%) or severe forms of the disease (1%), e.g West-Nile Neuroinvasive Disease (WNND) characterized by meningitis, encephalitis or acute flaccid paralysis [24].

Yet, our knowledge of the mechanisms underlying the virus ability to disseminate and evolve towards increased or decreased virulence in birds and mammals and transmission by European mosquitoes need to be assessed in order to refine epidemics risk assessment and preparedness in Europe [24].

WNV Israel 1998 (WNV IS98) and WNV Italy 2008 (WNV IT08) are two Mediterranean lineage 1 strains that caused outbreaks in avifauna with different severity. While IS98 was highly virulent in domestic and wild birds, IT08 induced low mortality in the wild avifauna. This observation led us and others [25] to suspect that genetic differences between the two strains may account for differential virulence in birds. Dridi and colleagues performed experimental infections of specific-pathogen free (SPF) chicks to confirm the significant difference of virulence between the two strains in an avian model of WNV virulence [25]. They demonstrated the higher virulence of IS98 compared to IT08. We characterized the first WNV molecular determinants driving IS98-increased avian pathology by using for the first time a reverse genetics approach and the generation of IS98-IT08 chimeras (Fiacre *et al*, 2023, not published). Genetic motifs implicated in differential pathogenesis in birds were consequently identified in the NS4A/NS4B/NS5 and 3'UTR regions. Reverse genetics has been used for decades to identify amino acids involved in WNV virulence and has led to significant progress in understanding viral pathogenesis [26]. We initially used a plasmid method to create chimeras between the two parental strains IS98 and IT08 by replacing the NS4A, NS4B, NS5 and/or 3' UTR regions of IS98 by the corresponding regions of IT08 and conducted *in vivo* experiments in mammals (BALB/cByJ mice) and birds (SPF chicks) (Fiacre *et al*, 2023, not published). Our results suggest a role of the 3' end of the WNV genome, especially the NS4A/NS4B/5'NS5 regions, in the decreased virulence of IT08 in SPF chickens, possibly due to the NS4B-E249D mutation. Other genetic markers could influence virulence of IS98 and IT08 in birds and

mammals. Genome comparisons suggest a possible role of NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V and NS5-R422K (not demonstrated) in attenuated phenotypes in mice. A previous extensive review of molecular determinants of WNV virulence in vertebrates and invertebrates showed that critical motifs are disseminated all over the viral genome, including the 5'UTR and 3'UTR regions, and key residues in the envelope (E) and Non Structural 1 (NS1) proteins, E-159, NS1-175 or NS1-130 (Fiacre et al, 2020). Studies on molecular determinants of the virulence of European and Mediterranean WNV strains are scarce. In this context, the present study reports further investigations on other NS and structural proteins in order to complement the list of virulence determinants implicated in differential neuropathogenesis between WNV IS98 and WNV IT08 using the new innovative reverse genetic ISA-method (*Infectious Subgenomics Method*) [27]. We designed six chimeric constructs between the structural, NS1, NS2, NS3, NS4 and NS5 regions of high- and low-virulence strains for birds, IS98 and IT08 respectively and tested them *in vitro* and *in vivo* on BALB/cByJ mice and on *Culex pipiens*, the primary mosquito vector for WNV transmission in Europe and more specifically in the Mediterranean basin [28], [29], [30].

2. Material and method

2.1 Cell lines and viruses

Vero (ATCC CCL81), HEK-293 (ATCC CRL1573) and HEK-293T cells (ATCC CRL3216) were maintained at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher scientific) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1mM sodium pyruvate, penicillin (1U/mL) /streptomycin (1 µg/mL) and 2mM L-glutamin. C6/36 cells (ATCC CRL1660) were maintained at 28°C, in Leibowitz L-15 Medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, penicillin (1U/mL)/streptomycin (1 µg/mL), 1mL non-essential amino acids, and 2 mM L-glutamin (Thermo Fisher Scientific). BHK-21 (ATCC CCL10) were maintained at 37°C in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza) and penicillin (1U/mL) /streptomycin (1 µg/mL).

2.2 Generation of chimeric viruses using innovative reverse genetic ISA method

The procedure is described in detail in Aubry et al.[27]. Briefly, overlapping PCR fragments generated with a high-fidelity polymerase and reconstituting the entire WNV genome of IS98, IT08 or chimeric IS98-IT08 viruses were transfected in cells sustaining efficient WNV replication.

2.2.1. Preparation of PCR products for the ISA method

The complete genome, flanked respectively at the 5' and 3' extremities by the human cytomegalovirus promoter (pCMV) and the hepatitis delta ribozyme followed by the simian virus 40 polyadenylation signal (HDR/Sv40p(A), was amplified by PCR in 6 overlapping DNA fragments of approximately 2.5kb, 1.1 kb, 1.1 kb, 3.2 kb, 2.9 kb and 725 bp . For WNV IC-IS98 and IT08 (WNV-IC-98 was generated by Bahuon et al. [31]), DNA fragments were obtained by RT-PCR from clarified cell supernatants. Total RNA was extracted using the MagVet Universal Isolation kit (ThermoFisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) according to the manufacturer's instructions and amplified using the Invitrogen™

SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System with the Platinum SuperFi DNA polymerase (ThermoFisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) to minimize PCR mutations. Amplifications were performed on an AB 7300 Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems) with the following conditions: (i) 50°C for 30 minutes (cDNA synthesis), (ii) 94°C for 2 minutes (pre-denaturation), (iii) 40 amplification cycles with 94°C for 15 seconds - 64°C for 30 seconds - 72°C for 2 minutes or more - depending on the expected fragment size (1min/kb), (iiii) final elongation at 72°C for 10 minutes. Sizes of all PCR products was verified by gel electrophoresis and purified using PCR PureLink™ purification kit (Invitrogen, Paris, France).

PCR fragments were amplified from Israel 1998/Italy 2008 viral genomic RNA with the following primers:

N° PCR fragment	WN-IS98	WN-IT08
1	Forward- AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTG	Same as WN-IS98
	Reverse- AGCTCTTGCCGGCTGATGTCTATG	Same as WN-IS98
2	Forward- ACGTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTC	Same as WN-IS98
	Reverse- AAGAACACGACCAGAAGGCCCAAC	Same as WN-IS98
3	Forward - CCCTCGTGCAGTCACAAGTGAA	Same as WN-IS98
	Reverse- GGTGGTCGTGTCCCCCTTTTGTA	Same as WN-IS98
4	Forward- ATGCTCAGAAATGGTCTGTCTCGC	Forward - TCCTGCCCTCAGTAGTTGGAT
	Reverse- CCTCTTTGCGGTACCTAGTGAAC	Reverse - CCTCTTTGCGGTACCTAGTGAAC
5	Forward- TGAACGCAACAACACTGCCATCG	Forward - ATTGGACTTGCCACATCATGCG
	Reverse- CCGGCCGACTTTCTC	Reverse - CCGGCCGACTTCTCCTTAAA
6	Forward- CCGAGCCACGTGGGCAGAAAAYA	Same as WN-IS98
	Reverse- AGATCCTGTGTTCTCGCACCACC	Same as WN-IS98

2.2.2. Cell transfection

Cell transfection was performed as previously described by Driouich et al [32]. Briefly, one day before transfection, an equal quantity of HEK-293T and BHK-21 cells were plated in 96-well plate at the final concentration of 2×10^4 cells/well (1×10^4 HEK-293T cells + 1×10^4 BHK-21 cells). Transfection was performed using the Lipofectamine 3000 reagent (Invitrogen, Paris, France) and optiMEM (Gibco, ThermoFisher Scientific, Montigny-le-Bretonneux, France). A 100 ng aliquot of an equimolar mix of the 8 DNA fragments (6 of the viral genome, 1 for pCMV and 1 for HDR/Sv40p(A) ribozyme) was transfected into each well. Each transfection was repeated into 9 wells to ensure the production of the chimeric construct at least into one well. Transfected cells were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24h. At 24h post-transfection, cell supernatants were replaced by 100µL of DMEM fresh medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1mM sodium pyruvate, penicillin (1U/mL) /streptomycin (1µg/mL) and 2mM L-glutamin. Five days after transfection, cell supernatants were collected and then passaged once on confluent Vero cells plated in 96-well plates. After an incubation period of 5h, cells were washed with PBS 1X and 100 µL of fresh medium was added per well. Cell supernatants were passaged twice on confluent Vero cells. Between each passage, cell supernatants were diluted 1/1000 to be sure that infectious viruses were produced. The resulting virus stock productions, obtained after a total of 3 passages on Vero cells, were used to confirm the production of infectious particles by RT-qPCR, TCID₅₀ titration and whole-genome next-generation sequencing.

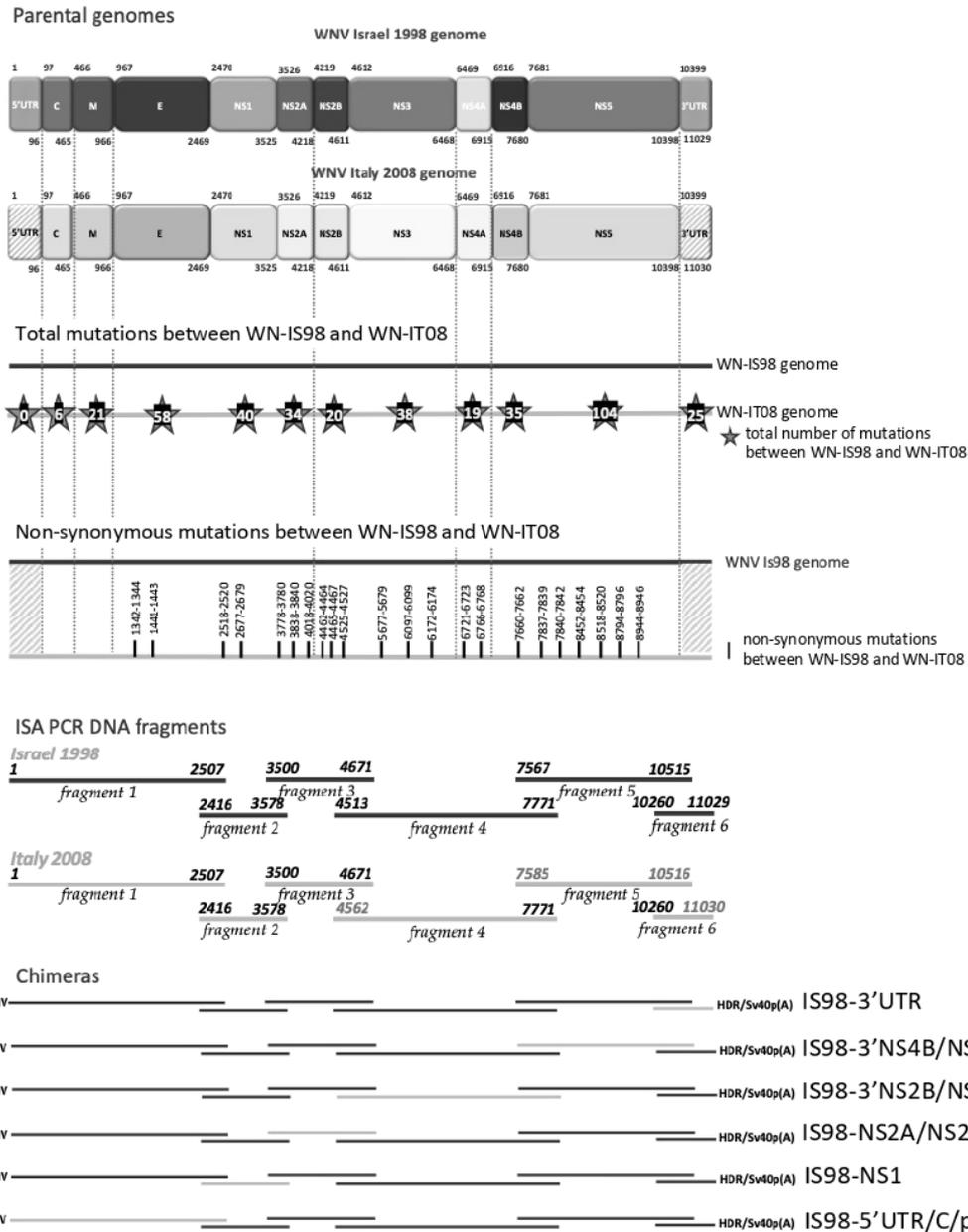


Figure 1. Schematic representation of chimeric constructs generated by the ISA method. Red lines represent Is98 genome or corresponding PCR products. Green lines represent It08 genome or corresponding PCR products. The total number of synonymous and non-synonymous mutations between the two strains are reported inside stars on It08 genome. The exact start and end nucleotide positions are mentioned for each ISA PCR DNA fragments. Chimeras are flanked respectively at 5' and 3' ends by pCMV promoter and HDR/Sv40p(A) ribozyme.

2.3. Next-generation sequencing of chimeric viruses

Complete genome sequencing was performed using Ion PGM Sequencer with the Torrent Suite 5.12 Software (ThermoFisher Scientific, France). Whole genome sequencing analyses was performed using the SISPA method developed by Gil et al (2020) for Illumina sequencing and further adapted to the IonTorrent procedure. Briefly, this method consists in three steps: (i) library preparation, (ii) sequencing matrix preparation, (iii) sequencing. Library preparation begins with (1) amplification using TagE_8N

oligonucleotides. These oligonucleotides bind randomly on the genome to generate PCR fragments covering the whole genome. (2) After that, Klenow enzyme leads to the production of complementary DNA strands. (3) amplification of PCR using a TagE oligonucleotide. (4) Addition of barcode adaptors. (5) Agencourt beads purification. (6) Gel-sizing to collect only 200 pb fragments. (7) RT-qPCR quantification of the library to estimate the quality of the library. Sequencing matrix preparation consists of clonal amplification by PCR emulsion, enrichment of ISPs loaded with DNA fragments and loading of v316 chips.

2.4. WNV plaque phenotype

Vero cells were seeded in 6-well plates and infected with the IC-WNV IS98, parental WNV-IT08 strain and the six chimeric viruses at 100 PFU for 1h30 at 37°C, 5% CO₂, time after which media containing the virus was removed. Cells were overlaid with a semi-solid medium of 2.4% Avicel, MEM 2X (ThermoFisher Scientific), 2.5% FBS (Lonza), 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher scientific) and 1% sodium pyruvate and incubated for 3 days at 37°C, 5% CO₂. The overlay was removed; cells were washed twice in PBS 1X and fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.4% crystal violet for 24h at room temperature.

2.5. Viral growth kinetic

Vero cells were seeded in 24-well plates and infected with parental WNV-IS98 and WNV-IT08 strain and the six chimeric viruses at MOI 0,1 in DMEM supplemented with 2% FBS. The cells were incubated at 37°C, 5% CO₂ and cell supernatants was harvested at the indicated times post-infection (17h, 24h, 48h and 72h). TCID₅₀ and genome copies for all time points were determined as described below.

2.6. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the MagVet™ Universal Isolation kit (ThermoFisher scientific, Montigny-le-Bretonneux, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and amplification were performed using the AgPath-ID One-Step RTPCR Kit (Applied Biosystems) as previously described in [33]. The amplification of West-Nile viral genome was achieved using the following specific primers (final concentration of 0.4 μM) WNproC-10 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3' and WNproC-132 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' and the probe (final concentration of 0.2 μM) 5' – FAM -CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT – Tamra - 3'. The housekeeping gene β -Actin was amplified using the primers (final concentration of 0.4 μM) ACTB-966 5'-CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3' and ACTB-1096 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' and the probe (final concentration of 0.2 μM) 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3' [34] [35]. RT-PCR were done in an AB 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the program: 45 °C for 10 min, 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60°C for 60s. Genome copies per microliter were calculated based on the threshold cycle (CT) values of a standard curve generated using the standard RNA of WNV and β-actin.

2.7. Virus titration by TCID₅₀

TCID₅₀ was determined using cell culture 96- well plates seeded one day prior to infection with Vero cells at a density of 2.10^4 cells/well. Briefly, virus stocks were 10-fold serially diluted in DMEM and 50 μ L of each dilution were inoculated into each well in quadruplicates. Plates were incubated for 3 days at 37°C, 5% CO₂ and 50 % tissue culture infection dose (TCID₅₀) was determined using the methodology described by Reed and Munch based on the number of wells displaying viral cytopathic effect (CPE).

2.8. Virulence in mice

Seven-weeks-old BALB/cByJ mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were housed in an environmentally controlled room under biosafety level 3 conditions and were given food and water ad libitum. Groups of five mice were inoculated intraperitoneally with 10 PFU of WNV IS98, IT08 and the chimeric IS98-3'NS4B/NS5 and IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B viruses prepared in DMEM or with DMEM alone for negative control. Every day, animals were weighed and monitored for the duration of the study (12 days) to detect the appearance of any clinical signs of illness or suffering. They were euthanized by cervical dislocation when the end point was reached e.g. when at least two of the following clinical signs were observed: weight loss greater than 15%, anorexia, ruffled hair, curved back, loss of balance, paresis. The presence of viral RNA was confirmed, by RT-qPCR in blood collected at 3-day pi (dpi) and in brain, heart and lung tissues, recovered shortly after their death.

2.9. Vector competence of *Cx. pipiens* mosquitoes

Culex pipiens infections were performed at the Institut Pasteur, Paris, France. Briefly, 5 to 7-day-old female mosquitoes were transferred into plastic boxes, starved for 24h in a biosafety level 3 insectarium, before being orally infected with WNV IS98, IT08, chimera IS98-3'UTR and IS98-3'NS4B/NS5 provided in a blood-meal corresponding to washed rabbit erythrocytes at a final viral concentration of 10^7 TCID₅₀/mL. The adenosine triphosphate (ATP) (Sigma-Aldrich) was added as a phagostimulant at a final concentration of 5×10^{-3} M. Fully engorged female were maintained in card boxes, at 28°C and 80% humidity for 14 days with a 12 L: 12 D circadian cycle and then processed for saliva collection [36]. Batches of around twenty female mosquitoes were dissected at 14 days post infection after cold anesthesia. Briefly, legs and wings of each mosquito were removed, and the proboscis was inserted into a 10 μ L tip containing FBS for saliva collection. Viral load in mosquito saliva was estimated by RT-qPCR and TCID₅₀. Head/thorax and body were separated from each mosquito and ground individually in DMEM (ThermoFisher Scientific). The infection rate and dissemination efficiency were assessed using RT-qPCR detection on body and head respectively whereas transmission efficiency was performed using TCID₅₀ viral titration on saliva. Infection rate corresponds to the percentage of mosquitoes presenting positive Ct after abdomen homogenization, compared to total mosquitoes dissected. Dissemination efficiency corresponds to the percentage of mosquitoes presenting positive Ct after head/thorax homogenization, compared to the total of mosquitoes positive for infection. Transmission efficiency corresponds to the percentage of positive saliva (evaluated by TCID₅₀ assay) compared to total mosquitoes positive for infection.

2.10. Statistical analysis

All statistical analysis were performed using GraphPad Prism software and the appropriated Kruskal-Wallis or Fisher's exact tests.

2.11. Ethic Statement

BALB/cByJ mice were housed at ANSES animal facilities (Maisons-Alfort, Paris). Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, February 6th, 2013). All experiments were approved by the joint Anses-UPEC-Alfort Veterinary School ethic committee under the permit number 2022-11-15-11.

3. Results

3.1. Next-generation sequencing of chimeric viruses

Next-generation sequencing allowed us to verify our constructions. Briefly, Figure 2 corresponds to the hiveplot representation of the sequencing data obtained for the 6 IS98-IT08 chimeras generated. For each chimera, three axes are represented. The one on the left correspond to WN-IS98 genome, the right axis correspond to WN-IT08 genome and the other correspond to the chimera sequence. Each colored curve represents genomic similarities between the parental viruses and the chimeric construct. Here, we confirm that chimera IS98-3'UTR is composed of WN-IS98 backbone except for 3'UTR region of WN-IT08, chimera IS98-3'NS4B/NS5 is composed of WN-IS98 backbone and 3'NS4B and NS5 from WN-IT08, chimera IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B is composed of WN-IS98 backbone and 3'NS2B,NS3, NS4A/NS4B from WN-IT08, chimera IS98-NS2A/NS2B is composed of WN-IS98 backbone and NS2A/NS2B from WN-IT08, chimera IS98-NS1 is composed of WN-IS98 backbone and NS1 from WN-IT08 and finally chimera IS98-5'UTR-C-prM-E is composed of WN-IS98 backbone and 5'UTR-C-prM-E proteins from WN-IT08, as expected. As PCR amplicons of WN-IS98 were performed from the IC-IS-98 infectious clone [31] a few non-synonymous mutations were detected between the WN-IS98 backbone of the chimeras and the sequence of the parental WN-IS98 isolate: NS1-N17S; NS2A-R165G; NS2B-G82D; NS2B-E83G, NS3-P496L, NS3-E521D and NS5-N280K. Importantly, IC-IS98 containing all these non-synonymous mutations did not any differences in replicative behavior in comparison with the parental WN-IS98 isolate *in vitro* or *in vivo* [31]. Moreover, mutations have been incorporated after ISA method, due to polymerase errors.

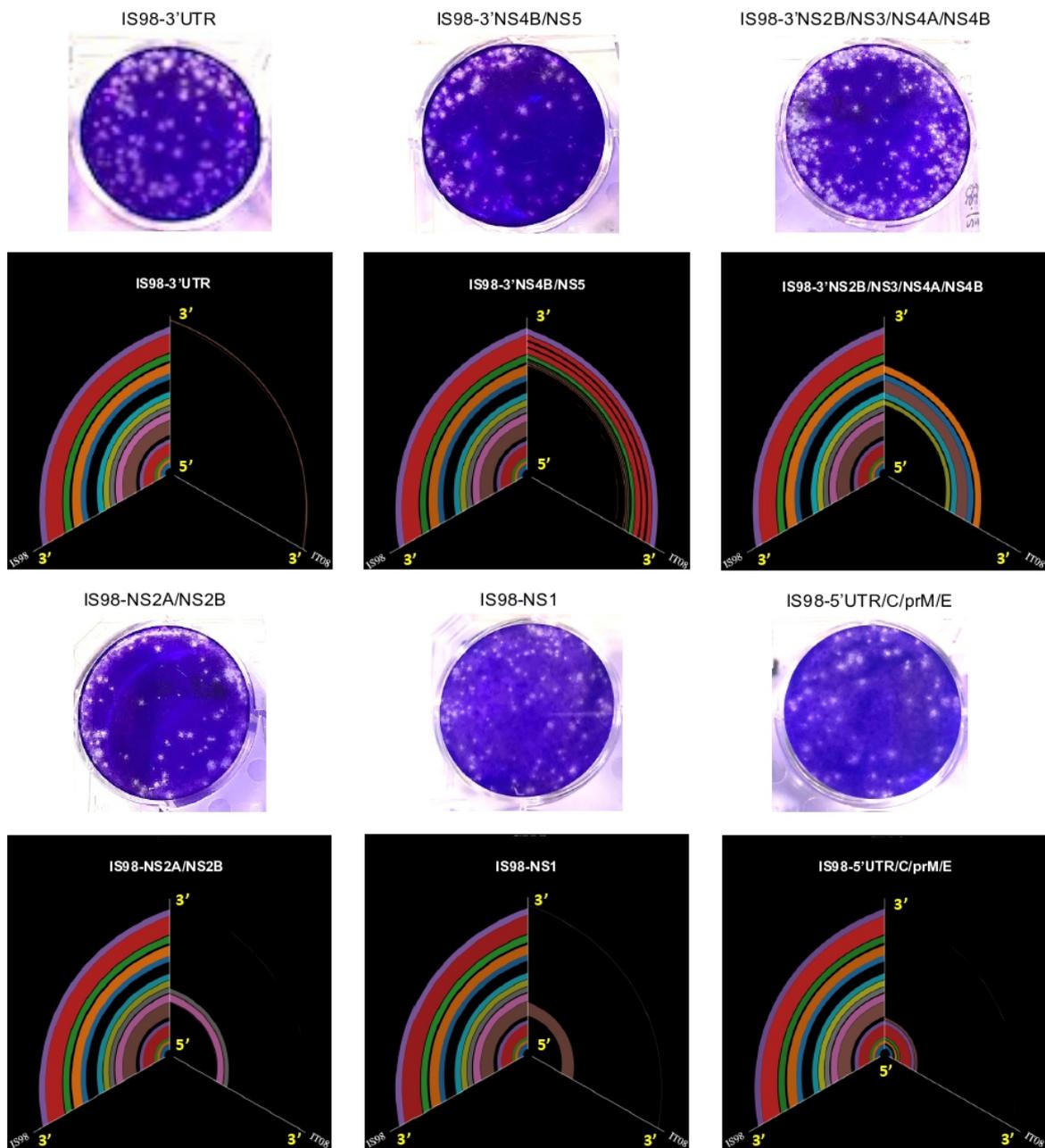


Figure 2. Hiveplot representation of the chimeric constructs sequences. The middle axis represents the chimeric genome, the left axis the WN-IS98 genome – the line between the two represents the shared genomic regions, based on blastx alignment on the pfam conserved domain DB-, the right axis is the WN-IT08 strain and lines represent shared regions between WN-IT08 and the chimeras.

Thanks to the genome sequencing data, we identified 7 non-synonymous mutations that could be the sequencing of quasi-species or errors during the genomic amplicons synthesis due to the ISA method. These mutations are: NS1-N207I (found on chimera IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B genome), NS3-R250K (found on chimera IS98-NS2A/NS2B genome), NS4B-C120F (found on chimera IS98-3'UTR genome), NS5-S54P (found on chimera IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B & IS98-NS2A/NS2B genomes), NS5-P431Q (found on chimera IS98-NS1 genome), NS5-L432I (found on chimera IS98-5'UTR/C/prM/E genome), NS5-V788I (found on chimera 4 genome).

3.2. Multiplication Kinetics of the Parental Wild Type (WT) isolates and Chimeras in Mammalian Cell Cultures (Vero)

Vero cells are mammalian cells allowing WNV amplification. Replication kinetics were performed on Vero cells to compare the replicative fitness of each chimeric constructs and parental strains. Vero cells were infected at MOI 0.1 and cell culture supernatants were harvested at 17h, 24h, 48h and 72h pi. Amounts of viral RNA and infectious particles were measured using RT-qPCR assay (number of genome copy/ μ L) and TCID₅₀ respectively. Replication kinetics of parental viruses were similar (Figure 2). However, differences were observed between chimeras, especially at 17h and 24h p.i. Interestingly, total viral RNA was significantly lower for IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B than for IS98-3'NS4B/NS5 ($p < 0,05$) or IS98-NS1 ($p < 0,0001$) at 17h and 24h p.i only. This result was confirmed by a significantly lower infectious titers of IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B than IS98-NS1 at 17h and 24h p.i. but the difference between IS98-NS2B/NS3/NS4A/NS4B and IS98-3'NS4B/NS5 at 17h p.i was not statistically significant.

These results suggest that the replication of IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B is decreased at earlier time points of infection before reaching a similar level at later time points (48h and 72 h p.i.)

The same observations were made when considering IS98-NS2A/NS2B and IS98-NS1. Total viral RNA quantity of IS98-NS2A/NS2B was lower than IS98-NS1 ($p < 0.01$) at 17h and at 24h p.i. ($p < 0.0001$). Viral infectious titers confirmed these results only at 24h p.i. ($>10^6$ TCID₅₀/mL for IS98-NS2A/NS2B and $>10^8$ TCID₅₀/mL for IS98-NS1). Surprisingly, total RNA quantification at 48h showed impaired replication of WN-IS98 and WN-IT08 in comparison with IS98-3'UTR and IS98-3'NS4B/NS5.

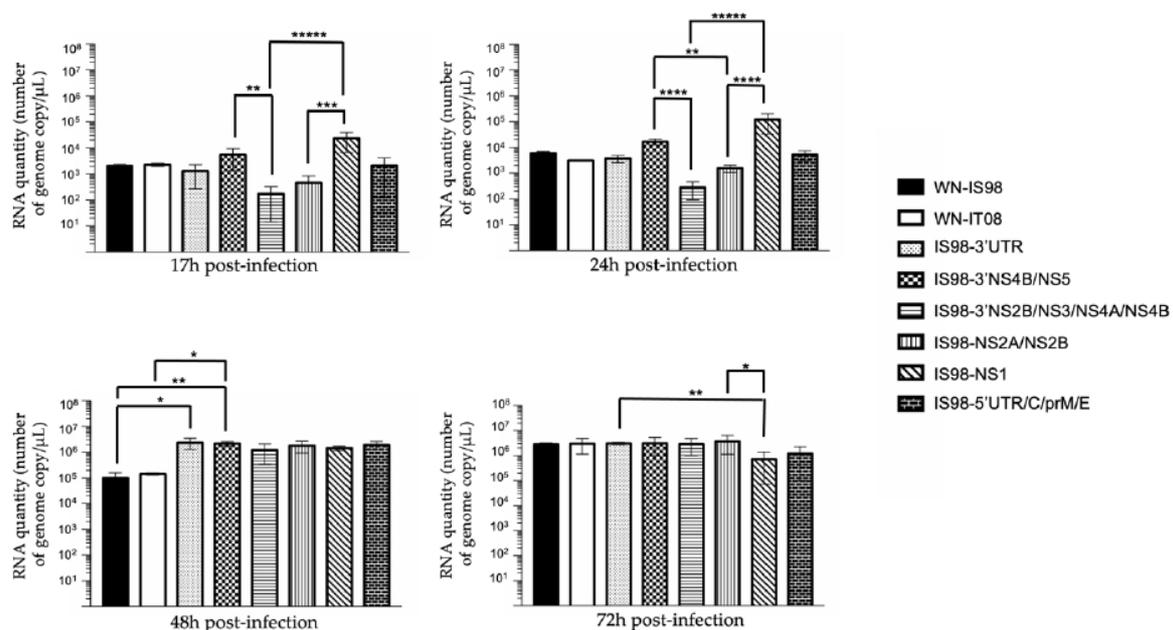


Figure 3. RT-qPCR analysis at 17h, 24h, 48h, 72h post-infection of parental strains and chimeras. Vero cells were infected with the indicated virus at multiplicity of infection (MOI) of 0,1. At the indicated time, cell culture supernatants were collected and analyzed by RT-qPCR. Number of genome copy/ μ L were quantified. Group statistical comparisons were performed by the non-parametrical Kruskal-Wallis test. Pair statistical comparisons were performed by Dunn's analysis. Each mean representation results from duplicate experiment, and in each

experiment each point was performed in triplicate. The error bare indicate standard deviations (SD) between the duplicates. *, $0.05 < P < 0.1$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $0.001 < P < 0.01$; ****, $P < 0.001$; *****, $P < 0.0001$.

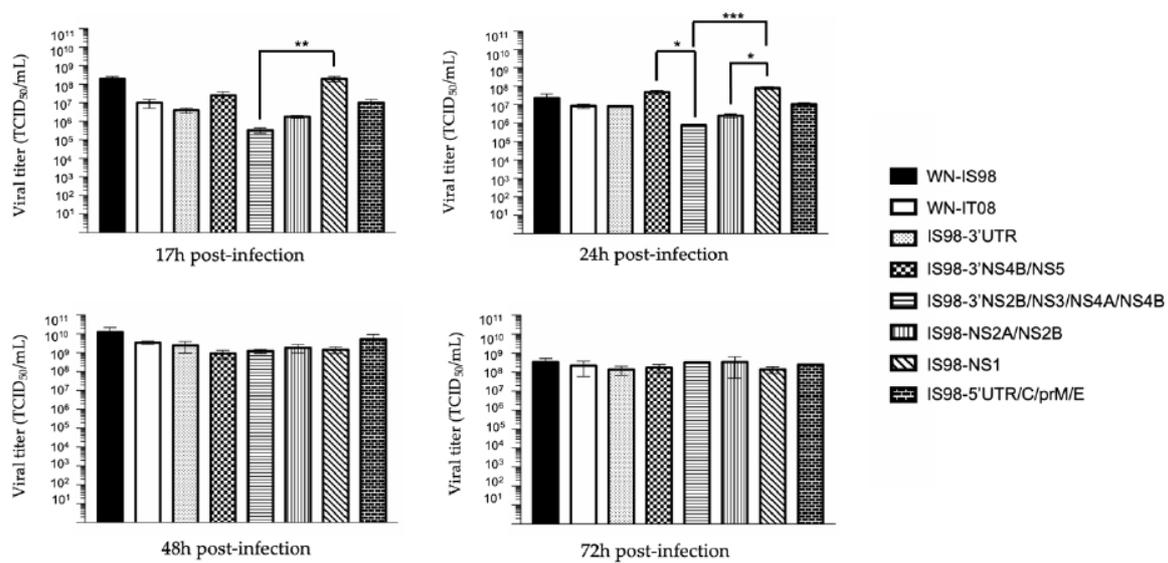


Figure 4. TCID₅₀ quantification at 17h, 24h, 48h and 72h post-infection of parental strains and chimeras. Vero cells were infected with the indicate virus at multiplicity of infection (MOI) of 0,1. At the indicated time, cell culture supernatants were collected and analyzed by TCID₅₀ quantification. Infectious virus titers were expressed in TCID₅₀/mL. Each sample was analyzed in triplicate. Group statistical comparisons were performed by the non-parametrical Kruskal-Wallis test. Pair statistical comparisons were performed by Dunn’s analysis. Each mean representation results from duplicate experiment, and in each experiment each point was performed in triplicate. The error bare indicates standard error of the mean (SEM) between the triplicate. *, $0.05 < P < 0.1$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $0.001 < P < 0.01$; ****, $P < 0.001$; *****, $P < 0.0001$.

3.3. Multiplication Kinetics of the Parental Wild Type (WT) isolates and Chimeras in Insect Cell Cultures (C6/36)

Replication kinetic profiles were assessed on the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36. Firstly, contrary to results obtained in Vero cells showing no replication impairment of parental WNV isolates, the parental strain WN-IS98 showed a significantly lower total viral RNA quantity than IS98-3’NS4B/NS5 at 17h p.i. ($p < 0,0001$), 24h ($p < 0,05$) and 48h ($p < 0,05$). Moreover, total RNA quantity of IS98-3’UTR seems to be significantly reduced compared to the parental strain WN-IT08 at 24h p.i. ($p < 0.001$), 48h ($p < 0.05$) and compared to WN-IS98 at 72h p.i. ($p < 0.01$). IS98-3’UTR is the chimeric construct that demonstrated the lower RNA quantity when compared with other chimeras, especially with IS98-3’NS4B/NS5 at 17h ($p < 0.0001$), 24h ($p < 0.0001$), 48h ($p < 0.0001$) and even 72h p.i. ($p < 0.0001$). Moreover, IS98-3’NS4B/NS5 presented significantly higher viral RNA copies than IS98-5’UTR/C/prM/E at 17h ($p < 0.05$), 24h ($p < 0.05$), 48h ($p < 0.05$) and 72h ($p < 0.05$).

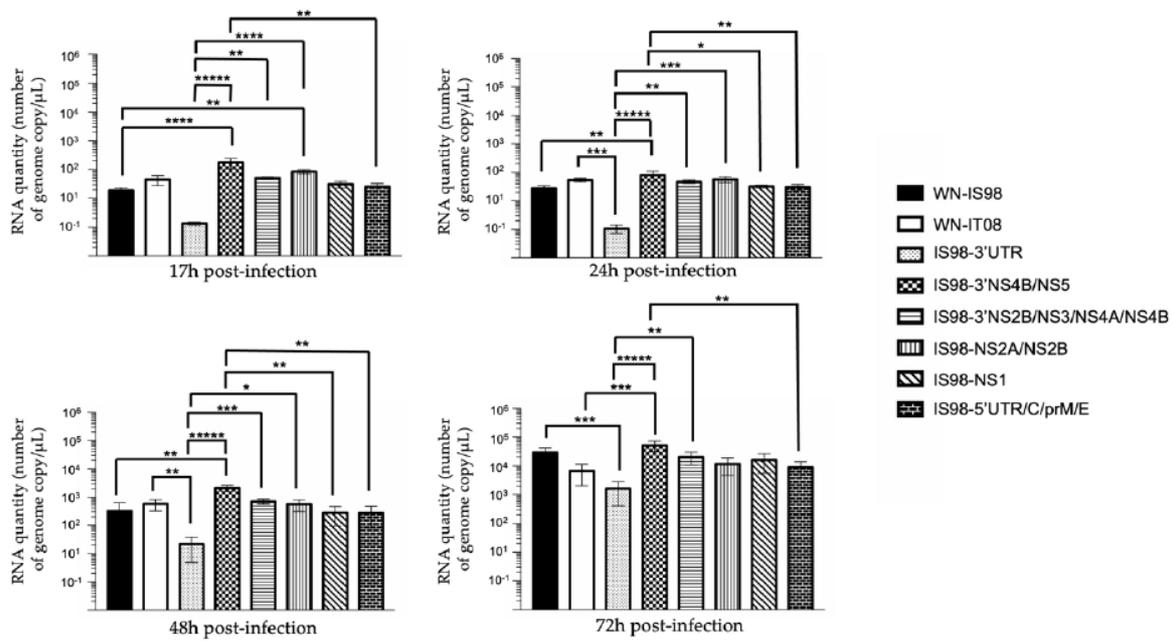


Figure 5. RT-qPCR analysis at 17h, 24h, 48h, 72h post-infection of parental strains and chimeras. C6/36 cells were infected with the indicated virus at multiplicity of infection (MOI) of 0,1. At the indicate time, cell culture supernatants were collected and analyzed by RT-qPCR. Number of genome copies/ μL were quantified. Group statistical comparisons were performed by the non-parametrical Kruskal-Wallis test. Pair statistical comparisons were performed by Dunn's analysis. Each mean representation results from duplicate experiment, and in each experiment each point was performed in triplicate. The error bare indicate standard deviations (SD). *, $0.05 < P < 0.1$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $0.001 < P < 0.01$; ****, $P < 0.001$; *****, $P < 0.0001$.

Cells supernatants of infected C6/36 mosquitoes cells at 0.1 MOI were collected at 17h, 24h, 48h and 72h p.i. Major difference was observed between IS98-3'UTR and IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B at 72 h p.i. ($p < 0.05$). IS98-3'UTR seems to present a lower viral titer than IS98-NS2A/NS2B at 17h p.i. ($p < 0.1$) and lower than WN-IS98 ($p < 0.1$) and with IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B at 72h p.i. ($p < 0.05$). Mostly, WN-IT08 seems to present a lower viral titer than IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B and IS98-NS2A/NS2B ($p < 0.01$).

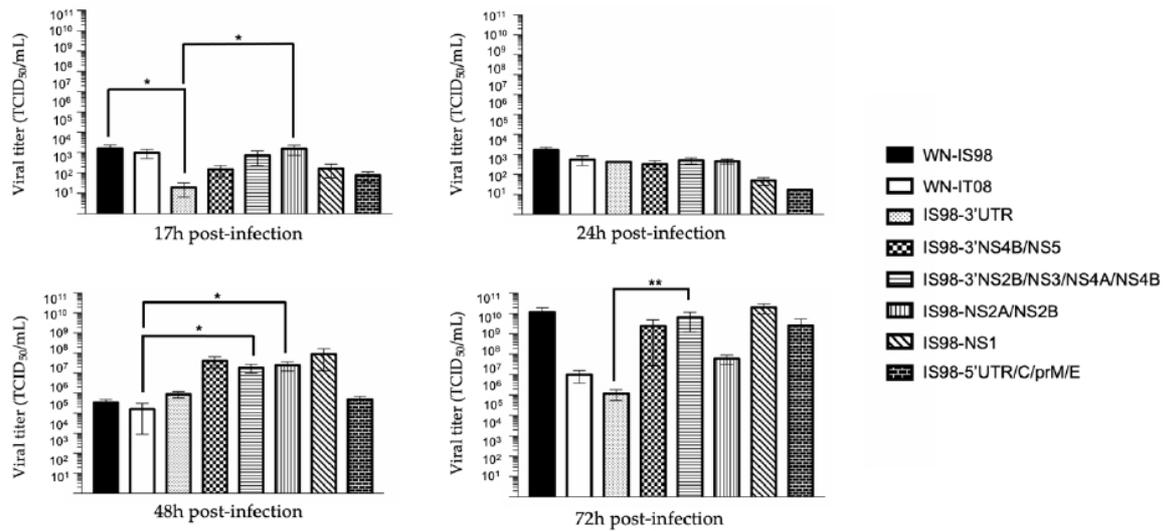


Figure 6. TCID₅₀ quantification at 17h, 24h, 48h and 72h post-infection of parental strains and chimeras. C6/36 cells were infected with the indicate virus at multiplicity of infection (MOI) of 0,1. At the indicate time, cells culture supernatant was collected and analyzed by TCID₅₀ quantification. Viral quantities of infectious virus are expressed in TCID₅₀/mL. Each sample was realized in triplicate. Group statistical comparisons are performed by the non-parametrical Kruskal-Wallis test. Pair statistical comparisons are performed by Dunn’s analysis. Each mean representation results from duplicate experiment, and in each experiment each point was performed in triplicate. The error bar indicates standard error of the mean (SEM) between the triplicate. *, 0.05<P<0.1; **, 0.01<P<0.05; ***, 0.001<P<0.01; ****, P<0.001 ; *****, P<0.0001.

3.4 Replication of parental and chimeric viruses in BALB/cByJ mice

In vivo experiments performed on the BALB/cByJ mice that are highly susceptible to WNV allowed to characterize WNV pathogenicity regarding viremia, organ dissemination, neuroinvasiveness and neurovirulence. BALB/cByJ mice were infected by WN-IS98 and WN-IT08 strains and chimeras IS98-3’NS4B/NS5 and IS98-3’NS2B/NS3/NS4A/NS4B regarding *in vitro* results.

As expected, a peak of viremia was reached at 3 days post-infection (Figure 7). No significant differences were observed between the tested viruses. Nevertheless, IS98-3’NS2B/NS3/NS4A/NS4B tends to induce lower viremia (<10¹ RNA copy/μL) than WN-IS98.

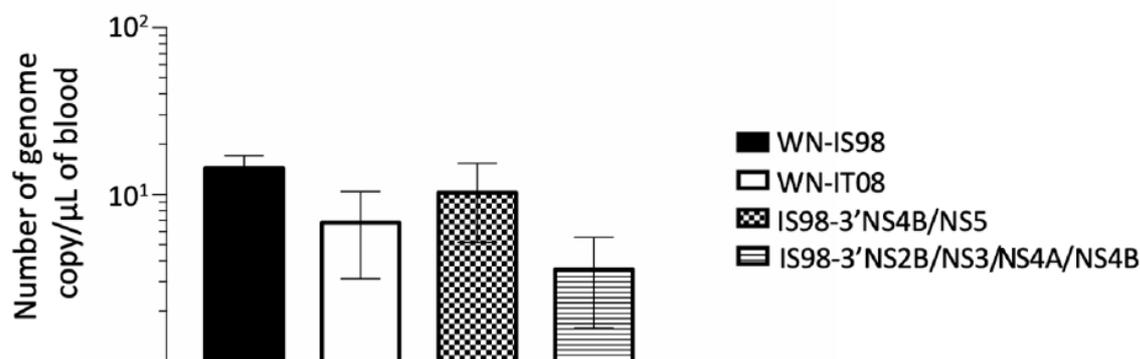


Figure 7. Viremia 3 days after intraperitoneal inoculation of female BALB/cByJ mice with 10 PFU of WNV IS98, WNV IT08 and chimeras IS98-3'NS4B/NS5 and IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B. Viral RNA load in blood was quantified by RT-qPCR. The error bar indicates standard error of the mean (SEM).

BALB/cByJ were monitored 12 days after i.p. inoculation. Firstly, all mice infected with the parental strain WN-IS98 died after 7 days p.i. whereas, only one mouse infected with WN-IT08 and another one with IS98-3'NS4B/NS5 died at the same day p.i.; Three mice infected by IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B died at eight days p.i.

As a neurotropic virus, neuroinvasion and neurovirulence of WNV strains are relevant parameters to evaluate. Total RNA quantification in brain samples were performed using RT-qPCR assay. Although no statistical differences were observed for total RNA quantification (Fig.8.b), WNV were detected in the brains of animals belonging to all four groups. Kruskal-Wallis analysis at 7 days p.i. shows a significant difference in mortality between IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B and WN-IS98 ($p < 0.01$) and between WN-IT08 and WN-IS98 ($p < 0.05$). No other differences were observed during mortality analysis (Fig.8.a).

Despite the fact that total RNA quantities in brain after they died were comparable between all four viruses, WN-IT08, IS98-3'NS4B/NS5 and IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B seems to induce delayed mortality in comparison with WN-IS98.

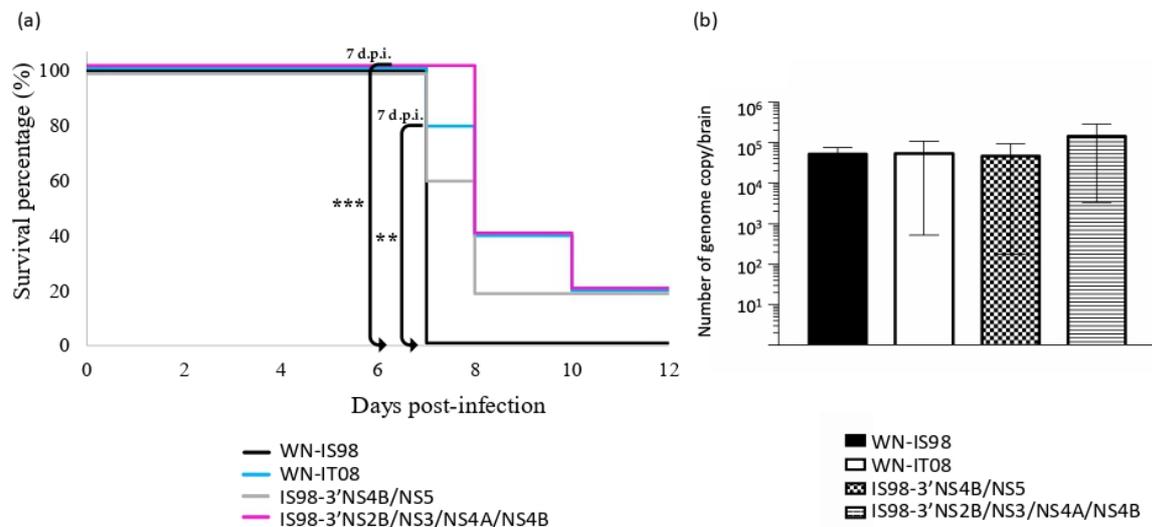


Figure 8. Neuroinvasive properties and neurovirulence of WN-IS98, WN-IT08 and their chimeras in two-week-old female BALB/cByJ mice. Mice were infected intraperitoneally with 10 PFU and monitored for 12 dpi. (a) Survival growth. (b) Genome quantification in the brain of dead mice assessed by RT-qPCR. The error bar indicates standard error of the mean (SEM). *, $0.05 < P < 0.1$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $0.001 < P < 0.01$.

3.5. Replication of parental and chimeric viruses in *Culex pipiens* mosquitoes

Compared to *in vitro* analyzes, *in vivo* testing in mosquitoes allows to anticipate vector competence, regarding infection rate (IR), dissemination efficiency (DE) and transmission efficiency (TE).

In order to assess the differential ability of parental and chimeric viruses to invade and cross the midgut barrier of *Culex pipiens* mosquitoes, the infection rate (IR), the dissemination efficiency (DE) and the transmission rate were firstly determined for parental strains WN-IS98/WN-IT08, and for the chimeras IS98-3'UTR, and IS98-3'NS4B/NS5. While IR reflects the infection rate of abdomens of engorged female mosquitoes among tested individuals, DE is the proportion of infected females with an infected head =, corresponding to mosquitoes in which WNV was able to cross the midgut barrier and penetrate the mosquito haemocoel. Finally, the ability of each tested viruses to reach the salivary glands was evaluated by determining the transmission efficiency (TE) which corresponds to the proportion of female mosquitoes that secrete infectious saliva among tested specimens.

The IRs were significantly higher for parental strains than for chimeric viruses IS98-3'UTR and IS98-3'NS4B/NS5 (Figure 10a).

Cx. pipiens infection with WN-IS98 and WN-IT08 led to higher percentages (67% and 73%) (Fisher's exact test) of infection than IS98-3'UTR (24%) ($p < 0.001$) and IS98-3'NS4B/NS5 (17%) ($p < 0.001$). However, no significant differences were observed between parental viruses or between the chimeras in terms of infection rates. Concerning the percentage of dissemination, significant differences were observed between WN-IS98 (42%) and IS98-3'NS4B/NS5 (80%) ($p < 0.1$), between WN-IT08 (43%) and IS98-3'NS4B/NS5 and between IS98-3'UTR (43%) and IS98-3'NS4B/NS5. However, no significant differences were observed in term of transmission between all four viruses, even though WN-IS98 and WN-IT08 tend to be more easily identified in salivary glands than IS98-3'UTR and IS98-3'NS4B/NS5 (Fig.10.a). Similar viral RNA loads, between 10⁵ and 10⁶ RNA copies, were identified in abdomens (10b), heads and thorax (10c) after infection with parental and chimeric viruses. Although not statistically significant,

differences in virus infectious titers were reported, with lower infectious titers for WN-IS98 and IS98-3'NS4B/NS5 (about 10^3 TCID₅₀/mL) and at least 10 times higher infectious titers for WN-IT08 and IS98-34UTR (about 10^5 TCID₅₀/mL)

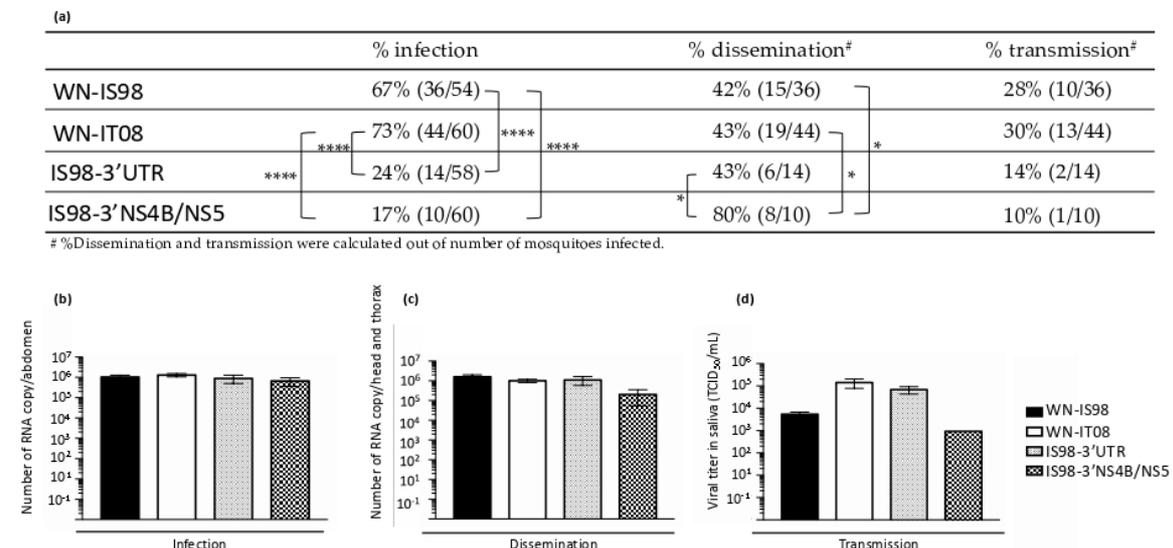


Figure 10. Infection, dissemination, and transmission rates after blood meal with 10^7 TCID₅₀/mL of WNV IS98, WNV IT08, IS98-3'UTR and IS98-3'NS4B/NS5. (a) Percentage of mosquitoes presenting an infection, dissemination, or transmission. (b) Viral titer in abdomen assessed by RT-qPCR. (c) Viral titer in head and thorax assessed by RT-qPCR. (d) Viral titer in saliva assessed by TCID₅₀ titration. The error bare indicate standard error of the mean (SEM). *, $0.05 < P < 0.1$; **, $0.01 < P < 0.05$; ***, $0.001 < P < 0.01$; ****, $P < 0.001$; *****, $P < 0.0001$.

4. Discussion

Our reverse genetic system adapt to two differentially pathogenic Mediterranean strains of WNV lineage 1, together with infections in *Culex pipiens* mosquitoes infection and BALB/cByJ mice, provided an useful tool to identify molecular determinants of WNV virulence and pathogenicity and to explore the mechanisms responsible for outbreaks of varying severity in a given host as described for two Mediterranean lineage 1 strains the highly virulent WNV IS98 in mammalian hosts and birds and the less virulent WNV strain IT08.

We identified recently the NS4A/NS4B/5'NS5 region as the molecular regions implicated in increased bird mortality during Mediterranean WNV outbreaks (Fiacre et al., 2023). Here, we complement the information on the role of other NS and structural proteins of WNV-IS98 and IT08 as virulence factors in mammalian hosts as well as factors modulating virus transmission in mosquito's vectors.

Six chimeric viruses were constructed between WNV-IS98 and IT08 focusing on the structural protein IS98-5'UTR/C/prM/E, and each NS proteins. IS98-3'UTR allowed to measure the impact of the replacement of the 3'UTR region, IS98-3'NS4B/NS5 for the 3'end of NS4B and NS5 coding regions, IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B for 3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B coding regions, IS98-NS2A/NS2B for NS2A/NS2B, IS98-NS1 for NS1 and IS98-5'UTR-C/prM/E for the 5'UTR and the structural proteins C/prM/E. Chimeras were generated using the versatile infectious subgenomic amplicons (ISA) reverse genetic technology [26]. The ISA method avoids limitations applied to the use of infectious bacterial clones such as propagation of cDNA copy in bacteria. Comparison of the replicative fitness of parental

and chimeric viruses were carried out in mammalian and mosquito cell culture models, and virulence and viral transmission were assessed *in vivo* in mice and *Culex pipiens* mosquitoes respectively.

Thirty-one mutations have been shown to be implicated in WNV virulence in mammalian model, as E-159, NS3-249 or NS1-175, but only few of them have been identified as molecular markers involved in virus replication in mosquito vector like NS3-483, NS1-175 and NS1-207 [24]. This suggests the need to better investigate molecular markers implicated in West Nile transmission cycle, considering mammalian and avian hosts, but also mosquito vectors.

We first investigated viral fitness and pathogenicity of chimeric and parental viruses *in vitro* on Vero cells and *in vivo* on BALB/cByJByJ mice respectively. Our results were indicative of a delayed replication of IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B *in vitro*, a finding confirmed by an attenuated phenotype *in vivo*. Indeed, viral RNA loads and infectious viral titers were significantly reduced at 17h and 24h p.i. compared to IS98-NS5 and IS98-NS1 (Figures 3 and 4). This trend was also observed with the parental strains and the other chimera. Surprisingly, this delay was fixed in less than 48h. This delay may have an impact on the early stages of infection (name the eclipse phase) and therefore on the infection dynamic of IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B in mice. The eclipse phase, during which no particles are produced, is defined by the time from viral entry until active production of viral particles. The probability of a minor or major infection of BALB/cByJ mice can be intimately linked to the initial number of virions and infected cells and therefore will define the within-host variability. *In vivo*, viremia (quantified at day 3 p.i.) of IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B infected mice tended to be lower than for other tested viruses. Furthermore, mortality rate at 12 days p.i. of mice infected with IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B was similar in mice infected with IT08 (80%), thus confirming the attenuated phenotype of this chimeric construct. In contrast, while IS98-NS5 showed an efficient early replication compared to WNV IS98 and IT08 *in vitro*, this result was not confirmed *in vivo*. IS98-NS5-infected mice exhibit a viremia as high as that of mice infected with parental viruses even if the mortality rate of IS98-NS5-infected mice was closer to that of IT08. In conclusion, IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B and IS98-NS5 showed an attenuated phenotype in comparison to the highly virulent IS98, confirming to our previous study suggesting the role of NS5 and 3'UTR in attenuated phenotype in mice [24].

In order to go further in the understanding of virulence factors having a role in the efficient transmission of WNV, we performed experiments in insect models, including *in vitro* assays on C6/36 cell line and competency challenges in *Culex pipiens* mosquitoes. Growth kinetics performed on C6/36 cell line argue in favour of an attenuated phenotype of IS98-3'UTR as evidenced by a lower viral RNA production compared to the parental viruses and the other chimera at different time points of the growth curves and a lower production of infectious virus particles at 17h post-infection. IS98-NS5 and IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B that displayed an attenuated phenotype in mice did not have any down-regulation of their replication in insect cells. We further assessed the vector competence of *Culex mosquitoes* with these different viruses. Vector competence is defined as the ability of an arthropod to transmit the pathogens after exposure to it. This combines the intrinsic ability of the virus to successfully enter, replicate within the vector and then disseminate, replicate in the salivary glands before being released at a sufficient concentration in order to infect a naïve vertebrate host. Even if IS98-3'UTR and IS98-NS5 infected less *Cx. pipiens* than WNV IS98 and IT08, they however disseminated as efficiently as their parental strains. Moreover, the transmission rates of chimeric constructs were 50% lower than that of parental strains. Our results suggest that the 3'UTR and the NS5 genomic regions of IS98 are essential virulence factors implicated in the infection of *Cx.pipiens* and the release of the virus in the saliva. All together, these results suggest that *C. pipiens* is less competent for the two chimeric viruses in contrast to both of their unmodified progenitors. This could result to one or the combination of the two following scenarios. The phenotype of the chimeric viruses could have been modified by single point mutations introduced unintentionally in the parental sequences by using reverse genetics. The altered phenotype may also result from the reassociation of genomic regions coming from two different parental strains leading to sub-optimal functional interactions at the molecular level during the virus cycle.

We hypothesized that the replacement of the 3'UTR region of IS98 by the corresponding region in IT08 counterpart altered genome interactions involved in the first steps of West Nile virus replication in mosquito vector. 5'UTR region and 3'UTR region can form conserved stem-loop structures [37], [38]. Two long distance RNA interactions have been identified in flaviviruses. The first is the interaction mediated by base-pairing between a conserved sequence element (5'CS; a mosquito-borne flavivirus-conserved sequence located in the N-terminal coding region of the C gene) and 3'CSI (conserved sequence in 3'UTR region) [39]. It has been demonstrated that the 5'CS/3'CSI interaction plays an important role in RdRp NS5 polymerase activity [40], [41]. The second interaction occurs between 5'UAR region (upstream the initiation AUG region, in the 5'UTR region) and 3'UAR region (located at the bottom portion of the 3' stem-loop of the genome). 5'UAR region extends from nt 82 to nt 95 of 5'UTR region and 3'UAR region extends from nt 10950 to nt 10962 (total genome numeration). 3'CSI region extends from nt 10923 to nt 10934 (total genome numeration). However, comparison of the 3'UTR regions focusing on 3'UAR and 3'CSI did not show nucleotides substitutions between the parental strains and their corresponding sequences in IS98-3'UTR. However, the 9 substitutions found in 3'UTR between WN-IS98 and IS98-3'UTR (nt 10517, nt 10520, nt 10523, nt 10689, nt 10721, nt 10775, nt 10830, nt 10832, nt 10852) might affect the correct hairpin conformation of the 3'UTR region and effective functional interactions between 5'CS and 3'CS found in the parental strains, leading to altered vector-pathogen interactions and reduced *Cx.pipiens* competency. Moreover, IonTorrent sequencing of IS98-3'UTR shows two substitutions, one non-synonymous NS4B-C120F and one synonymous NS5-N867N, that could also play a role in the differences observed

As previously discussed in Fiacre *et al.*, the NS5 protein is composed of many important conserved sequences implicated in viral replication such as the K-D-K-E catalytic terad, the PDZ-Binding domain or single mutations, but none of them are different between WN-IS98 and WN-IT08, suggesting that other mutations could be responsible of these differences, as those present on WN-IT08 vs WN-IS98: NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A732V and NS5-R422K. Moreover, IS98-NS5 includes the NS4B-E249G mutation implicated in the attenuated phenotype of WNV in vertebrate hosts (mammals and birds). Van Slyke *et al.*, [42] identified mutations in the NS4B region including NS4B-E249G (spot on WNV strain lineage 1 Birds 1153 (strain isolated in Texas in 2003) in addition with prM-V156I and NS5-A804V [43]) that are responsible of enhanced phenotype, with enhanced transmission characteristics, especially at 14 days p.i. in *Culex tarsalis*. Our results suggest that in mosquitoes, NS4B-E249G, by itself, could possibly promote passage of the virus through midgut epithelium, helping dissemination. Nevertheless, without the contribution of other known virulence factors such as prM-V156I and NS5-A804V, infection and transmission in mosquitoes seemed to be attenuated, suggesting the cumulative role of molecular markers in virus-vector interactions leading to efficient transmission by *Culex* vector.

Davis *et al.* [43], have also shown that Bird 1153 WNV strain containing prM-V156I, NS4B-E249G and NS5-A804V (compared to WN-NY99), displayed an attenuated phenotype in mice. In the present study, we demonstrated that IS98-NS5 (IS98-3'NS4B/NS5), containing NS4B-E249G mutation and NS5 genomic region of IT08 tended to be attenuated in mice, although its dissemination was enhanced in *Culex pipiens*, as shown for Bird 1153 with enhanced transmission in *Cx.tarsalis* [42]. To conclude, the NS4B-E249G mutation together with mutations identified in the NS5 genomic region of WN-IT08 (NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V285A, NS5-N280K, NS5-A372V, NS5-R422K) are good candidates to explain the attenuated phenotype in mice and enhanced dissemination by *Cx.pipiens*. However, we showed in Fiacre *et al.* (2023), that IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 chimera containing NS4B-E249G was not attenuated in mice model, unlike the findings of this study, suggesting the role of cumulative molecular changes in host virulence. Here, IS98-NS4B/NS5 containing NS4A from IS98 is attenuated in mice model, suggesting possible role of NS4A in the modulation of virulence in mammals.

IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B displayed an attenuated phenotype *in vitro* on Vero cells and *in vivo* in mice. We published in Fiacre *et al.*, that IS98-NS4A/NSAB/5'NS5 showed an attenuated phenotype only in SPF chickens. Our results suggest (i) the essential role of 3'NS2B and NS3 genomic regions in main virus-host protein interactions and direct replication in mammals or the role of specific mutations in this phenomenon (namely NS3-P496L, NS3-E521D). This chimeric construct exhibits other non-synonymous substitutions located in the NS1 (NS1-N207I known as a molecular factor implicated in attenuated phenotype in mammals [44] but probably induced by *SuperFi* polymerase, when PCR fragments were amplified) and in the NS4/NS5 genomic regions (NS4A-A85I, NS4A-P100S, and NS5-S54P).

Comparison of WN-IS98 and WN-IT08 genome showed 22 non-synonymous mutations, including E-V159I, also found on IS98-NS1. Kobayashi *et al.* [45], demonstrated that E-I159V increased virulence in a mouse model. Here, the mammalian attenuated phenotype of WN-IT08, can be due to many changes developed upstream in the discussion section and may also be due to the E-V159I mutation. Regarding Kobayashi *et al.* results, changing in Isoleucine at amino acid E-159 can participate to reduce WNV virulence. However, our study did not show any differences in viral behavior between WN-IS98 and WN-IT08, suggesting that E-V159I, as well as the known mutation NS4B-E249G and other non-synonymous mutations, cannot alone be responsible for modulation in vector replication. As previously shown by Moudy *et al.* [46], E protein modification on amino acid 159 (E-U159C, found in WN02) can also be implicated in a shortening of the extrinsic incubation period modification.

To conclude, our study improved our knowledge on the molecular determinants that can be responsible for the attenuated phenotype of WN-IT08 in mammalian hosts namely 3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B and possibly NS3-P496L, NS3-E521D, NS4A-A85I and NS4A-P100S mutations. We cannot exclude the fact that creating chimeras induced new mutations, that possibly modulated mammalian virulence as the well-known molecular determinant NS1-N207A or the mutation NS5-S54P. As seen before in Fiacre *et al.*, NS5 modifications present in WN-IT08 can, through genomic interactions participate to attenuation. We also showed that no differences in vector competence was detected for WN-IS98 and WN-IT08, despite the fact that NS4B/NS5 and possibly the NS4B-E249G substitution improved dissemination in *Culex pipiens*. Infection and transmission of viruses by *Culex* vectors seem to be influenced through NS3/NS4A/NS4B/NS5 virus protein-vector protein interactions. Our results also suggest a role of 3'UTR in vector infection/transmission, especially nt 10517, 10520, 10523, 10689, 10721, 10775, 10830, 10832 and 10852.

Finally, our study supplements our vision into genetic factors that may influence virulence of these two differentially pathogenic European WNV lineage 1 looking at mammalian and vector hosts. We emphasized the fact that it is needed to look at virulent factors as an all in order to guide experiments. Further studies are needed to understand the correlation between infection dynamics in vectors and virulence/pathogenicity in vertebrate hosts and to suggest therapeutic and prophylactic targets that will be efficient on all compartments of WNV transmission cycle.

5. References

1. Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol.* 2007,6, 171–81.
2. Smithburn K, Hugues T, Burke A, Paul J. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1940, s1-20, 471–492

3. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis.* 1953, 93, 207–18.
4. Melnick JL, Paul JR, Riordan JT, Barnett VH, Goldblum N, Zabin E. Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1951, 77, 661–5.
5. Lanciotti R, Roehrig J, Deubel V, Smith J. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, 1999, 286, 2333-7.
6. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* 2001, 951, 117–26.
7. Schuffenecker I, Peyrefitte CN, el Harrak M, Murri S, Leblond A, Zeller HG. West Nile virus in Morocco, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2005, 11, 306–9.
8. Benjelloun A, El Harrak M, Belkadi B. West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review. *Transbound Emerg Dis.* 2016, 63, e153–9.
9. Amraoui F, Krida G, Bouattour A, Rhim A, Daaboub J, Harrat Z, Boubidi SC, Tijane M, Sarih M, Failloux AB. *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley fever viruses in the Maghreb region. *PLoS One.* 2012, 7, e36757.
10. Assaid N, Mousson L, Moutailler S, Arich S, Akarid K, Monier M, et al. Evidence of circulation of West Nile virus in *Culex pipiens* mosquitoes and horses in Morocco. *Acta Trop.* 2020, 205, 105414.
11. Ergunay K, Gunay F, Erisoz Kasap O, Oter K, Gargari S, Karaoglu T, et al. Serological, molecular and entomological surveillance demonstrates widespread circulation of West Nile virus in Turkey. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014, 8, :e3028.
12. M'ghirbi Y, Mousson L, Moutailler S, Lecollinet S, Amaral R, Beck C, et al. West Nile, Sindbis and Usutu Viruses: Evidence of Circulation in Mosquitoes and Horses in Tunisia. *Pathog Basel Switz.* 2023,12, 360.
13. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2002, 8, 392–7.
14. Green MS, Weinberger M, Ben-Ezer J, Bin H, Mendelson E, Gandacu D, et al. Long-term Death Rates, West Nile virus epidemic, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2005, 11, 1754–7.
15. Malkinson M, Banet C, Khinich Y, Samina I, Pokamunski S, Weisman Y. Use of live and inactivated vaccines in the control of West Nile fever in domestic geese. *Ann N Y Acad Sci.* 2001, 951, 255–61.
16. Hoffmann L, Mouchet J, Rageau J, Hannoun C, Joubert L, Oudar J, et al. Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. II. Esquisse du milieu physique, biologique et humain. *Ann Inst Pasteur.* 1968, 114, 521–38.
17. Hannoun C, Panthier R, Mouchet J, Eouzan JP. [ISOLATION IN FRANCE OF THE WEST NILE VIRUS FROM PATIENTS AND FROM THE VECTOR *CULEX MODESTUS FICALBI*]. *Comptes Rendus Hebd Seances Acad Sci.* 1964, 259, 4170–2.
18. Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis.* 2002, 777–82.
19. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* 2016, 35, 811–24.

20. Beck C, Leparç Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, et al. Contrasted Epidemiological Patterns of West Nile Virus Lineages 1 and 2 Infections in France from 2015 to 2019. *Pathog Basel Switz.* 2020 Oct, 9, 908.
21. Martin MF, Simonin Y. [West Nile virus historical progression in Europe]. *Virol Montrouge Fr.* 2019, 23, 265–70.
22. Riccardo F, Bella A, Monaco F, Ferraro F, Petrone D, Mateo-Urdiales A, et al. Rapid increase in neuroinvasive West Nile virus infections in humans, Italy, July 2022. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2022, 27, 2200653.
23. Komar N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res.* 2003, 61, 185–234.
24. Fiacre L, Pagès N, Albina E, Richardson J, Lecollinet S, Gonzalez G. Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts. *Int J Mol Sci.* 2020,21.
25. Dridi M, Rauw F, Muylkens B, Lecollinet S, van den Berg T, Lambrecht B. Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains. *Transbound Emerg Dis.* 2013, 2, 51–62.
26. Aubry F, Nougairède A, Gould EA, de Lamballerie X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective. *Antiviral Res.* 2015, 114, 67–85.
27. Aubry F, Nougairède A, de Fabritus L, Querat G, Gould EA, de Lamballerie X. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. *J Gen Virol.* 2014, 95, 2462–7.
28. Tsioka K, Gewehr S, Kalaitzopoulou S, Pappa S, Stoikou K, Mourelatos S, et al. Detection and molecular characterization of West Nile virus in *Culex pipiens* mosquitoes in Central Macedonia, Greece, 2019–2021. *Acta Trop.* 2022, 230, 106391.
29. Kampen H, Holicki CM, Ziegler U, Groschup MH, Tews BA, Werner D. West Nile Virus Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) in Germany. *Viruses.* 2020, 12, 493.
30. Toma L, Cipriani M, Goffredo M, Romi R, Lelli R. First report on entomological field activities for the surveillance of West Nile disease in Italy. *Vet Ital.* 2008, 44, 483–97.
31. Bahuon C, Desprès P, Pardigon N, Panthier JJ, Cordonnier N, Lowenski S, et al. IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus. *PloS One.* 2012, 7, e47666.
32. Driouich JS, Moureau G, de Lamballerie X, Nougairède A. Reverse Genetics of RNA Viruses: ISA-Based Approach to Control Viral Population Diversity without Modifying Virus Phenotype. *Viruses.* 2019,11.
33. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *Journal of virological methods.* 2007, 146, 355-8.
34. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J Virol Methods.* 2007, 146, 355–8.
35. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods.* 2007, 140, 115–23.
36. Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Failloux AB. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Eurosurveillance.* 2016, 21, 30333.

37. Brinton MA, Dispoto JH. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology*. 1988, 162, 290–9.
38. Brinton MA, Fernandez AV, Dispoto JH. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology*. 1986, 153, 113–21.
39. Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, et al. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol*. 1987, 198, 33–41.
40. Filomatori CV, Lodeiro MF, Alvarez DE, Samsa MM, Pietrasanta L, Gamarnik AV. A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev*. 2006, 20, 2238–49.
41. You S, Padmanabhan R. A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *J Biol Chem*. 1999, 274, 33714–22.
42. Van Slyke GA, Jia Y, Whiteman MC, Wicker JA, Barrett ADT, Kramer LD. Vertebrate attenuated West Nile virus mutants have differing effects on vector competence in *Culex tarsalis* mosquitoes. *J Gen Virol*. 2013, 94, 1069–72.
43. Davis CT, Beasley DWC, Guzman H, Siirin M, Parsons RE, Tesh RB, et al. Emergence of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology*. 2004, 330, 342–50.
44. Whiteman MC, Li L, Wicker JA, Kinney RM, Huang C, Beasley DWC, et al. Development and characterization of non-glycosylated E and NS1 mutant viruses as a potential candidate vaccine for West Nile virus. *Vaccine*. 2010, 28, 1075–83.
45. Kobayashi S, Kaneko C, Kawakami R, Hasebe R, Sawa H, Yoshii K, et al. Amino acid 159 of the envelope protein affects viral replication and T-cell infiltration by West Nile virus in intracranial infection. *Sci Rep*. 2020, 10, 7168.
46. Moudy RM, Meola MA, Morin LL. A Newly Emergent Genotype of West Nile Virus Is Transmitted Earlier and More Efficiently by *Culex* Mosquitoes. 2007. *Am J Trop Med Hyg*. 2007, 77, 365–70

2.2. Discussion de la partie 2

Les expérimentations *in vitro* se sont articulées autour de cinétiques d'infection, avec des points de récolte à 17h, 24h, 48h et 72h, après infection des surnageants de cellules reflétant un modèle moustique (cellules C6/36) ou mammifère (cellules Vero). Les résultats obtenus lors des quantifications par RT-qPCR du génome viral dans le surnageant de cultures infectées, ainsi que le titrage de particules infectieuses via la méthode des TCID₅₀, a mis en évidence une plus faible quantité de génome viral dans le surnageant ainsi qu'un titre infectieux parfois significativement plus faible de la chimère IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B lors de l'infection de cellules Vero, par rapport notamment à la chimère IS98-3'NS4B/NS5 ou encore la chimère IS98-NS1. Les chimères IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B et IS98-3'NS4B/NS5 ont donc été sélectionnées afin de poursuivre les études *in vivo* lors de l'infection de souris BALB/cByJ.

Les résultats *in vitro* obtenus après infection de cellules de moustiques C6/36, ont mis en avant une diminution de la quantité d'ARN viral, et de particules infectieuses, de la chimère IS98-3'UTR par rapport à la chimère IS98-3'NS4B/NS5. Ces deux chimères ont donc été retenues pour procéder aux gorgements *in vivo* de *Culex pipiens*.

Nous pouvons remarquer que bien que le design des chimères aient été réalisées en interchangeant des fragments tout au long du génome et même au niveau des protéines structurales, la zone allant de la région 3' de la protéine NS2B jusqu'à la fin du génome en 3'UTR semblent particulièrement importante dans l'atténuation de la souche, au regard des résultats *in vitro*, comparée aux autres régions (notamment les protéines structurales), dans la modification du comportement des virus considérés chez l'hôte mammifère ou le vecteur *Culex pipiens*.

L'infection de souris BALB/cByJ a permis de montrer que contrairement à ce qui pouvait être attendu suite aux expérimentations *in vitro*, les deux chimères analysées, IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B et IS98-3'NS4B/NS5 semblent montrer une diminution de la répllication. C'est particulièrement observable pour la chimère IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B qui produit un taux de survie post-infection significativement augmenté par rapport à la souche parentale Israël 1998. Le séquençage *IonTorrent* haut débit réalisé a permis de mettre en évidence l'apparitions de deux mutations non-synonymes non attendues que ce soit vis-à-vis du « squelette » WN-IS98 ou des fragments WN-IT08 introduits : NS1-N207I et NS5-S54P dans la chimère IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B, possiblement dues à des erreurs de polymérase lors de la réalisation de la technique ISA. Ces mutations, et notamment la mutations NS1-N207I positionnée sur un acide aminé connu comme impliqué dans la modification de la virulence chez l'hôte mammifère (Fiacre et al. 2020), sont également à prendre en compte dans l'interprétation des données. Les résultats obtenus suite à l'infection de souris BALB/cByJ avec les deux chimères considérées montrent un rôle important de la région 3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B dans la virulence chez les mammifères. Comparativement aux résultats obtenus dans la partie 1 qui montraient que la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 ne présentait pas d'atténuation chez

un modèle mammifère, nous montrons ici que l'ajout des séquences Italie 2008 de la protéine NS3 et la partie 3'UTR de la protéine NS2B dans un « squelette » Israël 1998 semblent pencher en faveur de l'atténuation de la souche Israël 1998 chez un modèle mammifère. Cela pourrait s'expliquer par les mutations synonymes ou non-synonymes présentes dans cette région, par les mutations ponctuelles apparues dans la construction, par l'impact qu'ont ces modifications dans les interactions protéines-protéines ou encore par l'ensemble de ces facteurs.

Le gorgement de *Culex pipiens* par les virus parentaux ainsi que les chimères IS98-3'UTR et IS98-3'NS4B/NS5, n'a montré aucune différence en termes de pourcentage d'infection entre les souches parentales. Toutefois, une baisse significative du taux d'infection pour les deux chimères considérées a été observée ($p < 0,001$). Aussi, la chimère IS98-3'NS4B/NS5 a montré un pourcentage de dissémination significativement plus élevé que les virus parentaux ou la chimère IS98-3'UTR. Ces résultats montrent d'une part que les régions 3'NS4B/NS5, et 3'UTR jouent probablement un rôle dans la capacité du VWN à infecter son vecteur moustique. L'absence de différences chez les virus parentaux à ce niveau peut suggérer que c'est l'interaction de ces régions avec d'autres régions du génome viral qui pourraient être impliquées. La région 3'UTR renferme plusieurs séquences connues comme impliquées dans la réplication du VWN, notamment par l'interaction avec des régions trouvées dans la partie 5'UTR du génome, par exemple les régions 3'UAR et 3'CS interagissant respectivement avec les régions 5'UAR et 5'CS. Or les séquences des souches parentales introduites dans IS98-3'UTR ne montrent pas de différence avec celles des souches parentales. Cela nous amène à penser que les différences en termes de pourcentage d'infection observées dans le cas de la chimère IS98-3'UTR peuvent être dues à des interactions impliquant les nucléotides nt 10517, nt 10520, nt 10523, nt 10689, nt 10721, nt 10775, nt 10830, nt 10832, nt 10852 introduites avec l'introduction de la région 3'UTR de IT08 dans IS98. Ces derniers, ainsi que les mutations ponctuelles inattendues et révélées lors du séquençage haut débit NS4B-C120F et NS5-N867N, sont des cibles potentielles pouvant expliquer les différences observées lors de l'infection de *Culex pipiens* par la chimère IS98-3'UTR par comparaison à IS98 parental.

De plus, le gorgement de *Culex pipiens* par la chimère IS98-3'NS4B/NS5, a non seulement montré une diminution du taux d'infection par rapport aux virus parentaux mais également une augmentation du taux de dissémination. IS98-3'NS4B/NS5 renferme entre autres la mutation non-synonyme NS4B-E249G, que nous avons précédemment montré comme un des acteurs possibles d'un phénotype atténué chez le poulet SPF (Partie 1). Van Slyke *et al.* (Van Slyke *et al.* 2013) ont montré l'importance de cette mutation (couplée aux mutations prM-V156I et NS5-A804V de la souche virale Bird 1153 isolée au Texas en 2003) dans l'atténuation de la compétence vectorielle de *Culex tarsalis* 14 jours après infection. Ici, les résultats obtenus avec la chimère IS98-3'NS4B/NS5 suggèrent que cette mutation pourrait avoir un rôle dans la dissémination du virus (c'est-à-dire le passage de la barrière intestinale et par conséquent la présence du virus dans l'hémocoèle). Toutefois, contrairement à Van Slyke *et al.*, nous n'avons pas confirmé le rôle de la région 3'NS4B/NS5 et possiblement la mutation NS4B-E249G dans l'infection et la compétence vectorielle chez *Culex pipiens*, ce qui suggère un rôle cumulatif des différentes mutations lors de l'infection chez le vecteur moustique.

3. Introduction de la partie 3

L'investigation des déterminants moléculaires de virulence peut revêtir principalement deux approches de génétique inverse. La première consiste en la réalisation de chimères virales entre des souches de virulence différente, par plusieurs techniques possibles, comme montré lors de la Partie 1 et de la Partie 2. La deuxième approche peut être basée sur la réalisation de mutations simples, par mutagenèse dirigée (Beasley et al. 2005). Dans cette Partie 3, nous avons décidé de nous pencher sur l'étude d'une mutation ponctuelle, la mutation NS3-P249T. En 2007, Brault *et al.* (Brault et al. 2007), montrent que la substitution d'une Thréonine en Proline à l'acide aminé n°249, est suffisante pour induire la virulence de la souche West Nile, chez la Corneille d'Amérique. L'acide aminé en position 249 de la protéine NS3, semble être un élément important dans les modifications de la virulence chez l'hôte. La présence d'une Proline à cette position a également été visible chez les souches responsables d'épizooties en Italie en 2008 (Capelli et al. 2013) ou en Grèce en 2010 (Papa et al. 2010). Langevin *et al.* (Langevin, Bowen, and Reisen 2014) se sont également intéressés à cette mutation, chez deux modèles aviaires, que sont la Corneille d'Amérique et le Moineau domestique, ce qui leur a permis de confirmer que la présence d'une Proline en position NS3-249 induit une plus forte virémie et mortalité chez les espèces testées. Les déterminants moléculaires pouvant être différents selon les hôtes, ils ont en parallèle évalué la virulence de la même souche (NS3-149P), chez un modèle mammifère, la souris CD-1. Étrangement, aucune différence n'a été observée chez la souris. Enfin, Sotelo *et al.* (Sotelo et al. 2009), ont montré que la souche WN du Maroc 2003, possédant un résidu Thréonine en position NS3-249 s'avérait être plus virulente chez la souris CD-1 que la souche d'Espagne 2007 possédant un résidu Proline au même emplacement.

L'évaluation de l'implication de la mutation NS3-249P semble pencher en faveur d'un phénotype plus virulent chez l'hôte aviaire tandis que l'effet reste plus controversé chez l'hôte mammifère. Aussi, à ce jour aucune étude n'avait été réalisée sur le rôle de cette mutation dans la modification de la compétence vectorielle chez le vecteur moustique.

La partie 3 a donc pour but d'évaluer l'impact de la mutation NS3-P249T (potentiellement responsable d'un phénotype atténué), et de vérifier la capacité de cette mutation à atténuer la virulence chez la Corneille Noire, de mieux comprendre l'impact possible dans la virulence observée chez l'hôte via l'infection de souris BALB/cByJ et enfin d'évaluer pour la première fois l'impact de cette mutation dans la compétence vectorielle de *Culex pipiens*.

3.1. Partie 3: ARTICLE 3: Proline residue at NS3₂₄₉ in a Mediterranean West Nile virus context confers increased virus replication and virulence in susceptible mammals and birds, but not in *Culex pipiens* mosquitoes

Article en cours d'écriture.

**PROLINE RESIDUE AT NS3₂₄₉ IN A MEDITERRANEAN WEST NILE VIRUS CONTEXT
CONFERS INCREASED VIRUS REPLICATION AND VIRULENCE IN SUSCEPTIBLE MAMMALS
AND BIRDS, BUT NOT IN CULEX PIPIENS MOSQUITOES**

Lowenski Steeve¹, Fiacre Lise^{1,3}, Dridi Maha², Bahuon Céline¹, Hamel Rodolphe⁴, Vangeluwe Didier⁵, Chaintoutis Serafeim⁶, Lilin Thomas¹, van den berg Thierry², Zientara Stéphan¹, Gonzalez Gaelle¹, Failloux Anna-Bella⁷, Marie Vazeille⁷, Lambrecht Bénédicte², Lecollinet Sylvie¹.

¹ ANSES, UMR1161 Virologie, INRA, ANSES, PRES ENVA, 23 avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France

² CODA-CERVA, Veterinary and Agrochemical Research Center, Operational Direction of Viral Diseases, Groeselenberg 99, 1180 Brussels, Belgium.

³ Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD), UMR ASTRE, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France

⁴ MIVEGEC, Univ Montpellier, IRD, CNRS, 34000 Montpellier, France.

⁵ Royal Belgian Institute of Natural Sciences, 29 rue Vautier, 1000 Brussels, Belgium

⁶ Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Faculty of Health Sciences, Aristotle University of Thessaloniki, University Campus, 54124 Thessaloniki, Greece

⁷ Institut Pasteur, Arbovirus et Insectes Vecteurs, Département de Virologie, Paris, France

1. Introduction

West Nile virus (WNV) is a Flavivirus belonging to the Japanese encephalitis serocomplex (JE), in the family *Flaviviridae*, that includes pathogen of animal and/or human importance such as the Saint Louis encephalitis, Japanese encephalitis, Yellow Fever, Zika and dengue viruses (Bahuon et al., 2016). WNV is maintained in an enzootic cycle between *Culex* mosquitoes and birds but can also accidentally infect other vertebrate animals, including horses and humans (Hayes et al., 2005), considered as dead-end hosts (Beasley et al., 2005; Deas et al., 2005; Shi et al., 2002). In most infected humans and equine, WNV infection is asymptomatic, but approximately 5-20% of infected animals may develop symptoms of WNV disease ranging from West Nile fever (fever, weakness, weariness, anorexia) to meningoencephalitis (behavioral impairment including hyperesthesia, aggressiveness, somnolence,...; ataxia, paresis or paralysis, muscle tremors) (Samuel and Diamond, 2006).

WNV was first isolated from the blood of a febrile woman in Uganda, Africa, in 1937 (Smithburn et al., 1940) and currently has a worldwide distribution that ranges from Africa, the Middle East, Europe, Asia, and Oceania to South and North America. WNV introduction and circulation have been demonstrated on multiple occasions in Southern Europe and the Mediterranean basin since the 1960s, with WNV activity having greatly increased for the last 5 years, associated with spread to Eastern countries in the 2000s and to Northern countries

more recently (Bahuon and Lecollinet, 2015). In the 1990s, epidemics with a high incidence of neurological disease and death have occurred in Eastern Europe and the Mediterranean area, e.g. in Israel in 1998, and more regularly in North America since 1999 (Beasley et al., 2005; Shi et al., 2002), associated with significant mortality in birds, a phenomenon that had not been previously reported (Malkinson et al., 2002).

WNV contains a positive single-stranded RNA genome of about 11,000 nucleotides comprising a single open reading frame flanked by two untranslated regions (UTRs) at the 5' and 3' ends. Genomic RNA codes for a single and long polyprotein which is co and post-translationally cleaved by cellular and viral proteases. There are three structural proteins (C, prM/M and E) followed by seven nonstructural (NS) proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), along with NS1' (Puig-Basagoiti et al., 2007), which results from a -1 ribosomal frameshift event (Melian et al., 2010). Structural proteins provide the structural elements of viral particles, while nonstructural proteins play a role in viral replication, virion assembly, and evasion of host antiviral immune responses (Kummerer and Rice, 2002; Liu et al., 2003; Liu et al., 2005; Munoz-Jordan et al., 2003; Pugachev et al., 2004).

Despite the well-described epidemiological patterns of WNV in North America, the basis for the emergence of WNV-associated avian pathology, is uncertain. (Brault et al., 2007) reported that the introduction of a T249P amino acid substitution in the NS3 helicase (found in North American WNV NY99 strain 382-99) in a low-virulence strain (Kenya KN-3829) was sufficient to generate a phenotype highly virulent to AMCRs (American Crows). Furthermore, comparative sequence analyses of full-length WNV genomes demonstrated that the same site (NS3-249) was subject to adaptive evolution. These phenotypic and evolutionary results provide compelling evidence for the positive selection of a mutation driving increased virogenesis and virulence in highly susceptible bird species. Presence of a proline residue at position 249 in NS3 has also been observed in strains that emerged during the last decades in Europe, whether of lineage 1 or lineage 2, particularly in the Southern Europe such as in Italy in 2008 (Capelli et al., 2013) and in Greece in 2010 (Papa et al., 2010).

While the importance of *NS3_{249P}* residue has been investigated in avian and mammalian susceptible species (Brault et al. 2007) (Langevin, Bowen, and Reisen 2014) in a North American WNV strain, the role of *NS3_{249P}* in the transmission of WNV has never been addressed, neither the impact of *NS3_{249P}* on virus replication and virulence in a European context and for European birds specifically. To answer these questions, we used reverse genetics designed for a Euro-Mediterranean WNV strain, the IS98 infectious clone (Bahuon et al., 2012), and compared the replication, transmission and virulence properties of the original virus harboring *NS3_{249P}* and of the corresponding *NS3_{249T}* mutant in mammalian (BALB/cByJ) and avian (carrion crow, *Corvus corone*) susceptible species, as well in *Ae.aegypti* mosquito cells and in *Culex pipiens*.

2. *Materiel and method*

2.1. *Cells lines*

Vero (ATCC CCL81) were maintained at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher scientific) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Lonza), 1mM sodium pyruvate, penicillin (1U/mL) /streptomycin (1µg/mL) and 2mM L-glutamin. *Ae. aegypti* Aag2 cells (kindly provided from Carol Blair, Colorado State University), were maintained at 28°C in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FBS (Dutscher, Brumath, France), Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and non-essential amino acids (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

2.2. *Viruses and virus preparation*

Lineage 1 clade IS98 (IS-98 STD1, Genbank accession no: AF481864) WNV strain – derived wild type and mutant infectious clones developed by Bahuon and co-workers (Bahuon et al., 2012) were used. The wild type infectious clone is characterized by a NS3-249Pro genotype and is therefore herein referred to as “WT Pro”. A NS3-249Thr mutant was generated by replacing the CCC codon (nucleotide 5357) by an ACC codon on the wild type infectious clone using QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, Ca). The mutant infectious clone is characterized by a NS3-249Thr genotype and is therefore herein referred to as “mutant Thr”. A Sac II restriction site was also generated by inserting a synonymous mutation in order to easily identify mutant Thr virions after RT-PCR using 5053F GGGCTTTATGGCAATGGAGTCA and 5396R TGGGTGAGGGTAGCATGACA primers followed by enzymatic digestion. Recombinant viruses were collected from infected Vero cell supernatants and titrated as described in Bahuon et al. (2012) after a 3 days incubation period for WT Pro and 5 days for mutant Thr viruses.

2.3 *Infection of Aedes aegypti cells*

Cells were seeded in culture plates at 3,2x10⁴ cells per cm². Then, cells were rinsed once with PBS and the different strains of WNV were added on the cells with a MOI of 0,1. The cells were incubated for 1h30 at 28°C. Next, the inoculum was removed and the cells were washed twice with PBS. Culture medium was added to each well and the cells were incubated at 28°C, 5% CO₂ for the duration of the experiment.

2.4. *Virulence in carrion crows*

Thirteen juvenile (less than 2 years of age) Carrion crows were caught in a cereal-baited trap set close to a rubbish tip in central Belgium. Birds were transferred to VAR biosafety level 3 (BSL-3) facilities and kept in isolators located in a room electrically lit 12 h/day. Isolators were kept at 20–22 °C and provided with perches and wood logs. Water and food (cereals and cat food) were provided ad libitum. Crows were acclimated to isolators 2–3 days before inoculation. Crows sera were drawn and assessed by competition ELISA (ID Screen West Nile Competition, ID.Vet, Montpellier, France) for the absence of pre-existing anti-WNV antibodies (data not shown). Crows were caught after an ad hoc derogation granted from the Nature and

Forests Department of the General Operational Direction of Agriculture, Natural Resources and Environment (Public Service of Wallonia), for catching *Corvus corone* and holding them captive for scientific purposes. Animal experiments were conducted under the authorization and supervision of the Biosafety and Bioethics Committees at the Veterinary and Agrochemical Research Centre, following National and European regulations (procedure agreement no. 111202-02).

In two separate experiments, Carrion crows were inoculated subcutaneously (S.C) in the cervical region with $10^{3.5}$ TCID₅₀ of mutant Thr or WT Pro diluted to 100 ml/dose in sterile PBS (Dridi et al., 2013b). Every experimental group included six (mutant Thr) or seven (WT Pro) birds. Disease symptoms were observed daily for up to 13 days post-inoculation (dpi). Dead birds were removed daily from the isolators and stored overnight O/N at 4°C or at -80 °C for periods of time extending exceeding 24 h if they could not be necropsied immediately.

2.5. Virulence in BALB/cByJ mice

Mice were housed in an environmentally controlled room under biosafety level 3 conditions and were given food and water *ad libitum*. Female outbred BALB/c mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were obtained at 5 or 3 weeks of age and were acclimatized for 1 week. All mice were 6 or 4 weeks of age at the start of the experiment *i.e* inoculation via intraperitoneal (*i.p.*) route.

4 to 5 mice per group were inoculated with diluent alone (PBS, endotoxin free, pH 7.4) or with 0,1, 1, 10, or 10^2 PFU (*i.p.*) of WT Pro or mutant Thr. Mice were evaluated clinically for 2 weeks. Observed clinical signs included ruffled fur, paresis, hind leg paralysis and tremors.

Blood was collected at day 4 post infection (p.i), and stored at -80°C before RNA extraction with the QIAamp viral kit (Qiagen) and quantitative RT-PCR (Linke et al.,2007) to assess presence of viral RNA. Brains and other organs (spleen, kidneys, and lymph nodes) were recovered from mice shortly after their death, and the presence of virus was confirmed by quantitative RT-PCR after RNA extraction with the RNeasy kit (Qiagen). Control and surviving mice were challenged 21 days after the first injection with 104 PFU of IS-98-ST1 wild type virus obtained as described in Bahuon et al. (2012). Mice were controlled for 2 weeks post challenge (p.c). Surviving mice were euthanized 15 days p.c..

Levels of interferon alpha were measured in pools of blood samples collected in EDTA 2 and 7 days p.i, using IFN alpha Mouse ELISA kit (PBL Assay Science) and following manufacturer's instructions. Blood samples were collected in EDTA on mice 18 days p.i and were tested for IgG neutralizing antibodies using ID-Screen West Nile Competition Kit (ID-Vet, Montpellier, France) and following manufacturer's instructions.

This study was performed in strict accordance with the French guidelines and recommendations on animal experimentation and welfare. The protocol was approved by the local Animal Ethics Committee (ANSES/ENVA/UPEC) (Permit Number: 15/02/11–13). Every effort was made to minimize suffering.

2.6. Infection of *Culex pipiens* mosquitoes

Culex pipiens infection were performed at the Institut Pasteur de Paris. Briefly, 5 to 7-day-old female were starved 24h before being transported into BSL-3 facilities and then feed for 30 minutes on Hemotek® system containing the blood/virus mixture heated at 37°C. *Culex* had

to bit through a pig membrane to become feeded, with the viral mixture containing 10^7 TCID₅₀/mL of WTPro and mutant Thr viruses and 5×10^{-3} M of adenosine triphosphate (ATP) as a phagostimulant. Fully engorged female were maintained in card boxes, at 28°C and 80% humidity with a 12 L : 12 D circadian cycle during 14 days. To evaluate vector competence female were dissected at 14 days post infection and saliva was collected. Briefly, legs and wings were removed, and proboscis was inserted into a 10 µL tip containing FBS. The infection rate and dissemination rate were assessed using RT-qPCR detection whereas transmission rate was performed using TCID₅₀ viral titration. Infection rate corresponds to RT-qPCR abdomens compared to total mosquitoes analyzed. Dissemination rate corresponds to positive heads/thorax on total positive infected mosquitoes. Head/thorax presence of the virus is due to the ability of virus to cross the intestinal midgut and spread to other parts of mosquito thanks to hemocoel. Transmission rate corresponds to the number of mosquitoes with infectious virus (TCID₅₀ quantification) in saliva compared to total infected mosquitoes.

2.7. Viral RNA Extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from the supernatants of Aag2 cells using TriREAGENT (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to manufacturer's protocol. The RNA pellet was resuspended in 30 µL of RNase free distilled water and stored at -80°C. 1 µg was used for reverse transcription using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) according to manufacturer's instruction. The Maxima™ Probe qPCR Master Mix (Fermentas, Saint Remy les Chevreuses, France) was used in all qPCRs. Each reaction of 20 µL contained 500 nM of forward primer (WNV_F- GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA), 500 nM of reverse primer (WNV_R- GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA), 250 nM of specific probe (FAM-GAAGGAGGACCCACATGTTG-BHQ1) and 1x Maxima™ Probe qPCR Master Mix as final concentration. Amplification in a Roche LightCycler 480 real-time PCR system involved activation at 95°C for 10 min followed by 40 amplification cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s. For quantification, quantified WNV RNA and b-actin RNA were used as a viral standard and to standardize RNA extractions, respectively. WNV RNA was obtained from viral cultures on Vero cells. b-actin RNA was kindly provided by the FMDV French Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort).

Total RNA was extracted from organs of *Culex pipiens* using the MagVet™ Universal Isolation kit (ThermoFisher scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse-transcribed and amplified using the AgPath-ID One-Step RTPCR Kit (Applied Biosystems). WNV RNA amplification using RT-qPCR was performed on RNA extracts obtained from *Culex pipiens* and mice with WNproC-10 5'-CCTGTGTGAGCTGACAACTTAGT-3' and WNproC-132 5'-GCGTTTTAGCATATTGACAGCC-3' were used at a concentration of 0.4 µM with the probe 5' - FAM - CCTGGTTTCTTAGACATCGAGATCT - Tamra - 3' (Linke et al. 2007) used at a concentration of 0.2 µM; primers ACTB-966F 5'CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC-3', ACTB-1096R 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3' and probes ACTB1042-67 5'-VIC-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA-3' were used for the amplification of cellular RNA. Primers and probes were used at 0.4 and 0.2 µM concentration, respectively. Reaction mixtures (25 µL) contained 5 µL RNA and all samples were analyzed in duplicate. Amplification was performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System or in a QS5 Real-

Time PCR system (Applied Biosystems), with the following cycle: 45°C for 10 min, 95°C for 10 min, 40 cycles consisting of incubation at 95°C for 15s, 60°C for 60s.

For quantification, quantified WNV RNA and β -actin RNA were used as a viral standard and to standardize RNA extractions, respectively. WNV RNA was obtained from viral cultures on Vero cells. β -actin RNA was kindly provided by the FMDV French Reference Laboratory (ANSES, Maisons-Alfort).

Crows were sampled for blood, oral fluid and feathers on 2, 4, 6, 9 and 11 dpi. Blood (0.25 ml) was collected from all the birds on -2 dpi, and on only half of the birds subsequently, via the cervical vein. The same birds were bled all over the infection period so that any secondary effect due to blood sampling could be detected by comparison with the non-bled sub-group. Blood was allowed to clot O/N at 4 °C. After centrifugation at 4000 rpm for 5 min, serum was collected and aliquots stored at -80 °C for further RNA extraction. Oral swabs were collected from every bird in parallel with the blood samples by using sterile ClassiQ swabs (Copan Flock Technologies Srl, Brescia, Italy). The swabs were immediately placed in 1.5 ml of a 3.7% Bacto™ Brain and Heart Infusion solution (BHI, Becton-Dickinson, Le Pont De Claix, France) supplemented with 106 U/l penicillin (Kela Pharma, Sint-Niklaas, Belgium), 2 g/l streptomycin (CERTA, SA Aca Pharma NV, Waregem, Belgium), 1 g/l gentamycin sulphate and 6.6% kanamycine sulphate 100_ (both purchased from Life Technologies, Paisley, UK). After thorough vortexing, swabs were removed and swab fluids stored at -80 °C until further RNA extraction. At the same time, one wing marginal covert feather was sampled from every bird and stored in 600 ml of RNA later (RNA Stabilization Reagent, Qiagen Benelux B.V., The Netherlands) at -80 °C for further RNA extraction.

RNA was extracted from serum and feather samples as previously described (Dridi et al., 2013a). RNA was extracted from oral swabs using a MagMAX™-96 AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Life Technologies Europe B.V., Gent, Belgium) according to the manufacturer's instructions. NS2a-specific rRT-PCR was performed on each of the extracts as described previously (Dridi et al., 2013a).

Tissue samples (brain, heart, spleen, kidney, liver, lung, pancreas and the portion of duodenum attached to it, and skin containing feather follicles) were collected from the Carrion crow cadavers. They were homogenized in a homogenization solution consisting of PBS supplemented with 106 U/l penicillin (Kela Pharma, Sint-Niklaas, Belgium), 10 g/l streptomycin (CERTA, SA Aca Pharma NV, Waregem, Belgium) and 0.25 g/l gentamycin sulphate (Life Technologies, Paisley, UK) in a ratio of 10% (weight/volume) using an Easy mix blender (AES Laboratoire, Bruchsal, Germany). After clarification at 2500 rpm for 10 min, 200 μ l of every supernatant were sampled for RNA extraction using a High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Two μ l (4% of total eluate) of each extract were subjected to the NS2a-specific rRT-PCR described previously (Dridi et al., 2013a).

2.8. Statistical analysis

Statistical analysis were generally performed using GraphPad Prism software. The Fisher Test was used to assess differences in mosquito infection, dissemination and transmission. A Mann-Whitney test was applied to evaluate differences in survival curves in mice. Paired T-test and One way ANOVA were used to determine statistical significance for viral loads between mice groups infected with the WT Pro or the mutant Thr viruses.

Statistical analyses of data obtained during infections of carrion crows were undertaken using Minitab 13 software (statistical programmes for Windows 2000) and differences were considered significant for $p < 0.05$. Statistical analyses were run on NS2a RNA levels in sera, feathers and oral swabs in order to compare the results from the two groups inoculated with WT Pro and mutant Thr at different dpi. Samples where no NS2a RNA could be detected by the rRT-PCR were assigned a $\text{Log}_{10}(\text{NS2a RNA copies}/\mu\text{l})$ value of 1.67 (NS2a-specific rRT-PCR threshold). After checking the validity hypotheses (normality of the criterion distribution for each group by the Ryan–Joiner test and homogeneity of the within-groups’ variances by the Levene test), the Student t test was carried out on this infectious clone criterion in order to compare the two inoculated groups. When normality or homogeneity of variance tests failed, the non-parametric Mann–Whitney test was used. Mann-Whitney test was applied to evaluate differences in survival curves. Paired T-test and One-way ANOVA were used to determine statistical significance for viral loads between groups infected with the parental or the IC derived viruses.

3. Results

3.1. Viral replication of NS3Pro and NS3Thr in Carrion Crows

Viraemia was detectable all over the follow-up period, from 2 dpi to 6 dpi, in all the bled crows of the WT Pro infectious clone group, where its average reached a peak of $10^{4.56}$ NS2a RNA copies/ μl at 4 dpi, whereas sera of all the bled crows of the mutant Thr infectious clone were at all times below detection levels for WN NS2a RNA ($10^{1.67}$ NS2a RNA copies/ μl , Fig. 1). The average viraemia, as measured by the NS2a RNA levels, was statistically significantly higher ($p < 0.05$) in the WT Pro-infected group than in the mutant Thr-infected group at 2, 4 and 6 dpi.

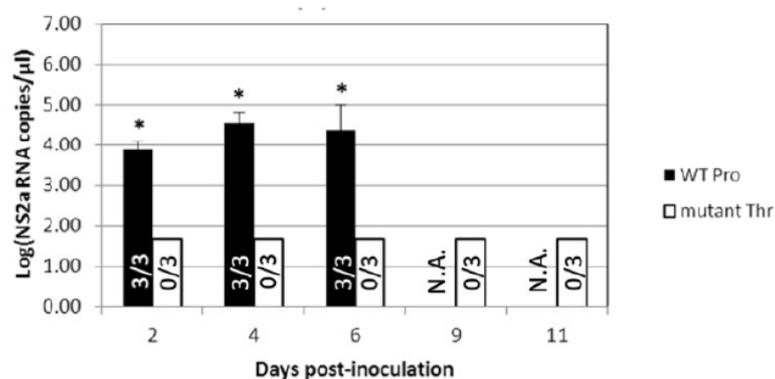


Figure 1. Mean viral load in sera over days post-infection as estimated by NS2a-specific rRT-PCR in juvenile Carrion crows experimentally inoculated with either WT Pro (black bars) or mutant Thr (white bars) WNV infectious clones. Blood was sampled from only three birds from each group as explained in the text. Viral load detection in serum represent the mean of the three crows (or less if crows had died in the meanwhile) chosen for sampling. Each point represents the mean of seven or six crows (or less if crows had died in the meanwhile). Error bars represent the standard error of the mean. Within the bars, numbers of positives/examined samples are indicated. N.A.: not applicable. *: $P < 0.05$ for WT Pro vs. mutant Thr at the same dpi.

3.2. Viral dissemination of NS3Pro and NS3Thr in Carrion Crows

WNV NS2a RNA was substantially detected in the oral swabs of the WT Pro-infected crows (Fig. 2a), where it was first detected at 2 dpi, with an increase all over the infection period up to an average of $10^{5.58}$ NS2a RNA copies/ μ l at 6 dpi. In the mutant Thr group, however, only low levels of WNV NS2a RNA ($10^{2.95}$ NS2a RNA copies/ μ l, individual data not shown) were detected at 2 dpi in one crow. At 4 and 6 dpi, average RNA levels in the oral swabs of the WT Pro-infected crows were significantly higher ($P < 0.05$) than that of the mutant Thr-infected crows.

WNV RNA detection in feathers followed a profile similar to the one observed for oral swabs (Fig. 2a, 2b). Indeed, viral RNA was first detected in feathers of the WT Pro-infected crows at 2 dpi, with an increase all over the infection period up to an average of $10^{4.37}$ NS2a RNA copies/ μ l at 6 dpi. In the mutant Thr group, however, levels of WNV NS2a RNA peaked at 4 dpi ($10^{3.42}$ NS2a RNA copies/ μ l on average) and were further detected only at 6 dpi in one crow ($10^{4.20}$ NS2a RNA copies/ μ l, individual data not shown). At 6 dpi, average RNA levels in the feathers of the WT Pro-infected crows were significantly higher ($P < 0.05$) than that of the mutant Thr-infected crows.

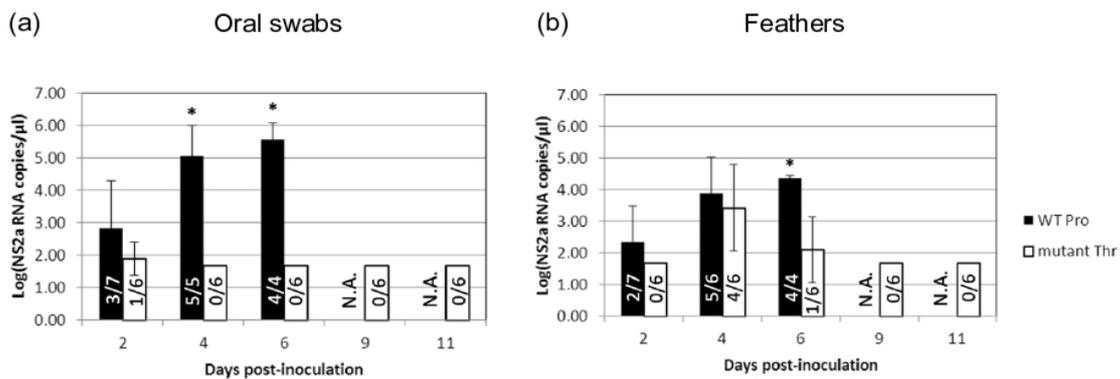


Figure 2. Mean viral load oral swabs (a) and feathers (b) over days post-infection as estimated by NS2a-specific rRT-PCR in juvenile Carrion crows experimentally inoculated with either WT Pro (black bars) or mutant Thr (white bars) WNV infectious clones. All the crows were sampled for oral fluid and feathers. As of viral load detection in oral swabs and feathers, each point represents the mean of seven or six crows (or less if crows had died in the meanwhile). Error bars represent the standard error of the mean. Within the bars, numbers of positives/total samples are indicated. N.A.: not applicable. *: $P < 0.05$ for WT Pro vs. mutant Thr at the same dpi.

3.3. Neurovirulence of NS3Pro and NS3Thr in Carrion Crows

All the crows infected with WT Pro infectious clone died at 2, 4, 5, 6 and 9 (1 crow), and 7 dpi (2 crows), whereas only one of the six crows infected with mutant Thr died, at 11 dpi (Fig. 3). A significant difference was observed between the two groups at 7 dpi (Wilcoxon Mann-Whitney; $P < 0.01$). Clinical symptoms such as low activity, prostration, lack of reactivity and hyperthermia - as evidenced by ruffled feathers - were observed for 24 to 48 H before death in crows of the WT Pro infectious clone group. Only one of the crows that survived the mutant Thr infectious clone infection started to show clinical symptoms, on the last day of the experiment at 13 dpi.

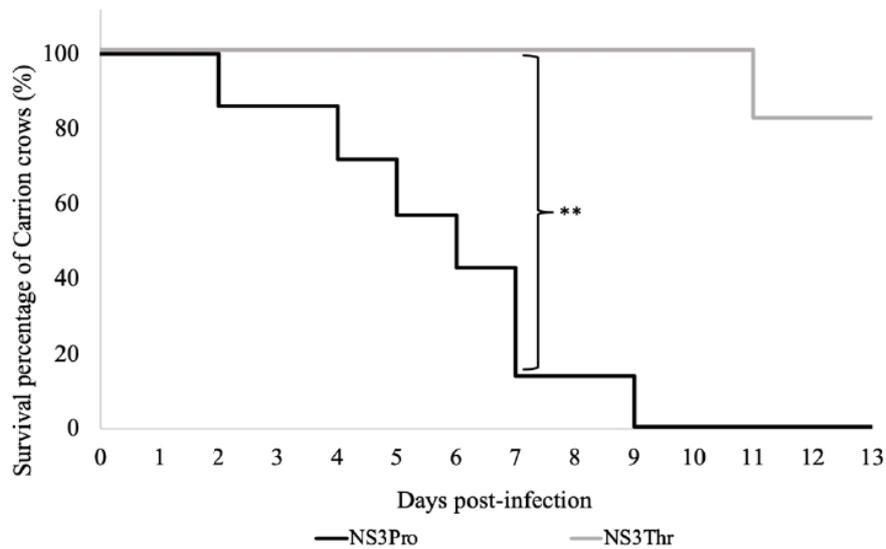


Figure 3. Mortality curves between in Carrion crows after s.c. inoculation at $10^{3.5}$ TCID₅₀/mL. **: P<0.01.

3.4. *In vitro* replication of NS3Pro and NS3Thr in Aag2 mosquitoes cells

Viral RNA loads and viral infectious titers were quantified in insect cells with no significant differences between WT Pro and mutant Thr viruses at all time points except at 2h p.i, at which timepoint lower viral RNA loads were observed for the WT Pro virus (Fig. 4).

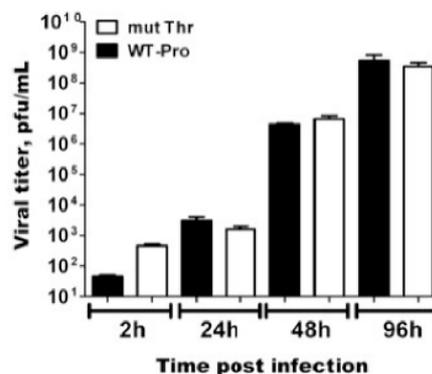
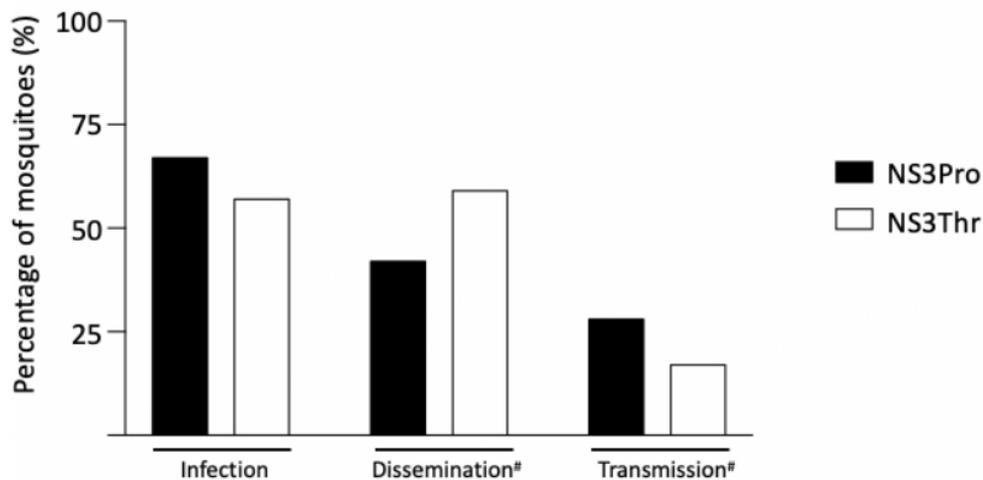


Figure 4. Multiplication kinetic of WT-Pro and mutThr in C6/36 cells at MOI 0,1.

3.5. *In vivo* replication of NS3Pro and NS3Thr in Culex pipiens mosquitoes

In vivo infection of *Culex pipiens* mosquitoes allow us to estimate the difference in vector competence between NS3Pro and NS3Thr virus. Statistical analyses performed by Fisher test, show no significant differences in infection, dissemination or transmission rates between the two viruses. Vector competence is estimated through transmission rates. Although no significant differences were shown in transmission rates, NS3Thr tends to show a lower transmission rate than NS3Pro (Fig. 5).



#calculated out of number of mosquitoes infected

Figure 5. Infection, dissemination, and transmission rates after blood meal with 10^7 TCID₅₀/mL of NS3Pro or NS3Thr. Detection of positive abdomen for infection and head/thorax for dissemination was performed using RT-qPCR analysis. Detection of positive saliva has been assessed by TCID₅₀ titration.

Infectious virus quantification by TCID₅₀ method into saliva showed no differences (data not shown), using Kruskal-Wallis test between NS3Pro and NS3Thr infected mosquitoes (around 10^4 TCID₅₀/mL).

3.6. Blood analysis of NS3Pro and NS3Thr in BALB/c mice

In mice, the average viremia detected at day 4 p.i, as measured in the 3'NC RNA levels, were significantly higher ($p < 0.05$) in the WT Pro, 10 and 100 PFU groups than in the mutant Thr respective groups, with the highest level measured for mice infected i.p with 10 PFU of WT Pro (Fig. 6a). No viremia was detected in the WT Pro and mutant Thr 0.1 PFU groups. Levels of viremia have an impact on the induction of innate immune responses, and as such alpha interferon levels (IFN- α) were measured with IFN alpha Mouse ELISA kit (PBL Assay Science) (Fig. 6b). IFN- α was not detectable in groups infected with 0.1 and 1 PFU of virus. A peak was measured with an infection dose for the 10 PFU WT Pro group. Levels were lower at 100 PFU. However, the highest level was measured at day 2 for the 10 PFU group. IFN- α levels were lower at day 7 p.i for this same group. Levels were not detectable for any infection group at day 2 and day 7 p.i for mice infected with mutant Thr virus.

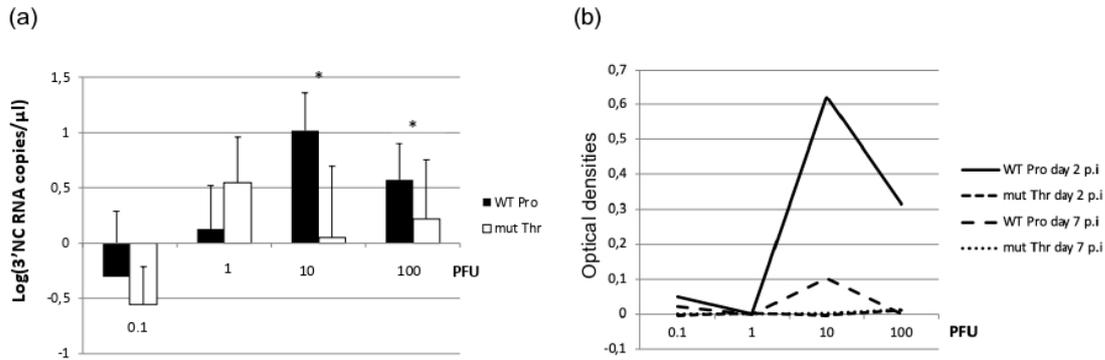


Figure 6. Blood analysis. (a) Mean viral load per μl of RNA extract eluate in 4 days p.i. sera in Balbc/J 5 week old female mice infected with 0.01, 0.1 or 1 PFU via the i.c. route of WT Pro (black bars) or mut Thr (white bars) virus as estimated by 3'NC-specific rRT-PCR. Blood was sampled in all mice from each group as explained in the text. Each point represents the mean of the five mice sampled per group. Error bars represent the standard error of the mean. (b) Optical Densities values of anti-Interferon-alpha antibodies measured in pools of sera sampled day 2 and day 7 p.i. in Balbc/J 5 week old mice infected i.p. with 0.1, 1, 10 or 100 PFU of WT Pro or mut Thr viruses. *: $P < 0.05$ for WT Pro vs. mutant Thr at the same infection dose.

3.7. Neuroinvasion and neurovirulence of NS3Pro and NS3Thr in BALB/c mice

Viral RNA was detected in brains of all dead animals infected via the i.p. route with no significant differences between WT Pro and mutant Thr viruses (Fig. 7). All surviving animals were tested for the presence of anti-WNV IgG 18 days p.i. (data not shown). Animals in the 1 PFU i.c. groups were all positive. All surviving animals in the 0.01 and 0.1 PFU i.c. groups were negative except for one mouse in the mutant Thr group, which is consistent with lower doses used to infect mice in the corresponding group.

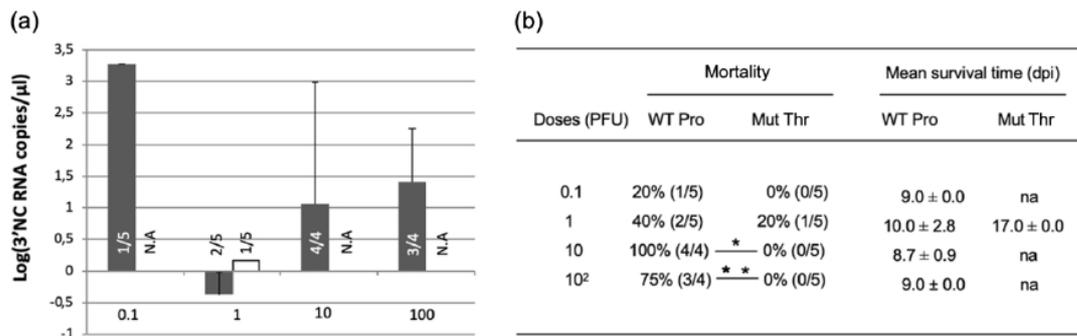


Figure 7. Neuroinvasion and neurovirulence in Balb/c mice. (a) Mean viral load per μl of RNA extract eluate of brains of dead Balbc/J 5 week old female mice infected with 0.1, 1, 10 or 100 PFU via the i.p. route (a) PFU of WT Pro (black bars) or mut Thr (white bars) virus as estimated by 3'NC-specific rRT-PCR. Blood was sampled in all mice from each group as explained in the text. Each point represents the mean of the five mice sampled per group. Error bars represent the standard error of the mean. Within the bars, numbers of examined samples are indicated. N.A.: not applicable. (b) Clinical illness in 5-week-old Balb/c mice infected with WT Pro and mut Thr virus via the i.p. route. Values show the mean number of days post-inoculation (dpi) \pm SD (Standard Deviation). The number of symptomatic mice is indicated in parentheses. N.A.: not applicable due to no weight loss or no mortality. Statistical analysis: survival curve (mortality), *: $P < 0.05$

As for experiments in crows, mice infected via i.p route with WT Pro infectious clone died of the infection following a classical pattern, with deaths occurring between day 8 and day 12, whereas mice infected with mutant Thr survived the infection at the exception of one individual infected with 1 PFU of virus that died 16 days p.i. Clinical symptoms included ruffled fur, prostration, tremors, and hind leg paralysis. Also, weight loss was rapidly induced upon infection with WT Pro virus (6-7 days p.i).

When mice were infected via the i.c route, clinical patterns were similar for both viruses. However, mice infected with mutant Thr virus died much later (8, 9, 11 and 17 days p.i) when mice infected with WT Pro died massively between day 7 and 8 p.i.

4. Discussion

Brault et al. (2007) demonstrated that a Proline amino acid residue at position 249 of the NS3 helicase was responsible of the virulence of the NY99 382-99 strain in American Crows (AMCR), while a Threonine residue reduced the virulence. The importance of the Proline residue was also asserted by the change of the Threonine residue in the Kenya KN-3829 strain by a Proline amino acid that enhanced the virulence of this non-pathogenic strain in AMCRs. NS3 is a 70 kDa multifunctional protein that is implicated in the replication of the viral genome and the cleavage of the viral polyprotein. NS3 displays a serine protease domain in its N-terminal end, and ATPase and helicase activities in its C-terminal end (Gorbalenya et al., 1989; Murray et al., 2010). The NS3 249 P residue is present in the helicase part of the protein. Mutations in NS3 have been shown to differentially modulate the virulence of the virus in highly susceptible AMCR birds (Langevin, Bowen, and Reisen 2014), depending on the NS3₂₄₉ residue considered. In this respect NY99 382-99 bearing NS3₂₄₉P was shown to be highly virulent for AMCR.

Based on results of Brault et al. (2007), a closer look was taken on the NS3 249 residue in other strains, particularly European strains. Sotelo et al. (Sotelo et al., 2009) observed that the SP07 Spanish strain, that possess a Proline residue, displayed a low pathogenic profile in Swiss mice, while the Morocco MO03, that has a Threonine residue, has a LD₅₀ ten times lower and similar to the LD₅₀ of the NY99 strain. Similar observations were made on Red Legged Partridges (*Alectoris rufa*) infected by SP07 or MO03 WN strains, with a survival rate of ca 25% with the MO 03 strain vs ca 70% with the SP07 strain.

Considering these data, we decided to have a closer look to the IS98 genomic context. We performed site directed mutagenesis on our IS98 infectious clone (Bahuon et al., 2012), to change the NS3 249 Proline residue by a Threonine residue. Recombinant viruses (wild type (WT Pro) and mutated (Mutant Thr) were then challenged on mice, birds, insect cells and on *Culex pipiens*. When injected intraperitoneally in female Balb c/J mice, parental virus was found to be highly virulent (Lethal Dose 50 (LD₅₀) < 1 pfu), while only 4 out of 20 animals infected with the NS3 249T virus succumbed, regardless of the initial infecting dose (1-10³pfu). Mice infected with NS3 249T virus experienced milder clinical and virological outcomes, with delayed and non fatal weight loss as well as decreased viremia 4 days pi (1.4x10³ vs 3.2x10⁴ viral copies/mL blood). Birds, eg. one-day old chicks and young corvids (*Corvus corone*), also indicated that NS3 249T virus was attenuated for model and susceptible European birds, with 16.7% (1/6) animals that died after subcutaneous infection with NS3 249T virus whereas a 100% lethality (7/7) was observed with parental NS3 249P virus. Replicative properties of the virus was not affected by the amino acid change in insect cells though and only a trend with

decreased transmission efficiency (not significant) was shown after *Cx. pipiens* infection by NS3Thr, compared to NS3Pro.

Our and others results tend to suggest that virulence is not driven by unique mutations but probably by a more global genomic context, in both the virus and the host side. The presence of a Proline residue at position 249 in NS3 appears as a primary determinant for WNV IS98 virulence in wild birds, as well as in mammals and could be a genetic factor accounting for enhanced reporting of WNV neuro-invasive diseases in humans infected by WNV strains. The existence of multiple natural (Ala, His, Pro, Thr and Asn) and experimentally derived (Valiakos et al., 2014) genetic variants at the NS3-249 locus, coupled with the finding that this residue imparts higher viremia potential in an avian host, highlight the potential for strong selective pressures being exerted on the NS3-249 locus, as observed in nature where a threonine (Thr) to proline (Prow et al., 2014) substitution has occurred at this locus on at least three independent occasions between lineage 1a WNVs, preceding human WNV outbreaks in Egypt (1950), Romania and Russia (1996) and Israel (1997–98) (Langevin et al., 2014) and at least on one occasion with lineage 2 WNV (Greece 2010). However, Langevin et al. (2014) engineered multiple amino acid substitutions were into a WNV infectious cDNA (NY99; NS3-249P) in order to evaluate the impact of NS3-249 variants on avian and mammalian virulence, and demonstrated variable helicase and ATPase activities; however, differences did not correlate with avian or murine viremia phenotypes. Comparable results were obtained in this study and the study performed by Langevin et al in susceptible birds suggesting that avian-specific phenotypes are modulated by critical viral-host protein interactions involving the NS3-249 residue that directly influence transmission efficiency and therefore the magnitude of WNV epizootics in nature.

The replicative default observed in the mutant Thr variant compared to the WT Pro may explain the default of IFN α response observed 2 and 7 days pi in mice, with a weaker stimulation of the IFN pathway due to a weaker viral load. Also like many flavivirus types including Dengue and yellow fever viruses, the nonstructural NS3 WNV is implicated in both polyprotein processing and RNA replication and is therefore a promising drug target (Chernov et al., 2008). To exhibit its proteolytic activity, NS3 proteinase requires the presence of the cofactor encoded by the upstream NS2B sequence. Chernov et al. (2008) determined that both the NS3 helicase and NS3 proteinase-helicase constructs are capable of unwinding both the DNA and the RNA templates. In contrast, the full-length NS2B-NS3 proteinase-helicase unwinds only the RNA templates, whereas its DNA unwinding activity is severely repressed. These data suggest that the productive, catalytically competent fold of the NS2B-NS3 proteinase moiety represents an essential component of the RNA-DNA substrate selectivity mechanism in WNV that possibly plays a role yet to be determined in WNV replication occurring both within the virus-induced membrane bound replication complexes in the host cytoplasm and in the nuclei of infected cells.

5. References

Brault, Aaron C, Claire Y-H Huang, Stanley A Langevin, Richard M Kinney, Richard A Bowen, Wanichaya N Ramey, Nicholas A Panella, Edward C Holmes, Ann M Powers, and Barry R Miller. 2007. "A Single Positively Selected West Nile Viral Mutation Confers Increased Virogenesis in American Crows." *Nat Genet.* 39(9):1162-6. doi: 10.1038/ng2097.

- Langevin, Stanley A., Richard A Bowen, and William K Reisen. 2014. "Host Competence and Helicase Activity Differences Exhibited by West Nile Viral Variants Expressing NS3-249 Amino Acid Polymorphisms." *PLoS One*. 9(6):e100802. doi: 10.1371/journal.pone.0100802.
- Linke, Sonja, Heinz Ellerbrok, Matthias Niedrig, Andreas Nitsche, and Georg Pauli. 2007. "Detection of West Nile Virus Lineages 1 and 2 by Real-Time PCR." *Journal of Virological Methods* 146 (1–2): 355–58. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.021>.
- Bahuon, C., Despres, P., Pardigon, N., Panthier, J.J., Cordonnier, N., Lowenski, S., Richardson, J., Zientara, S., Lecollinet, S., 2012. IS-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus. *PLoS one* 7, e47666.
- Bahuon, C., Lecollinet, S., 2015. Des saisons de transmission du virus West Nile contrastées en Europe. *Bulletin épidémiologique santé animale-alimentation*. 67, 19-22.
- Bahuon, C., Marcillaud-Pitel, C., Bournez, L., Leblond, A., Beck, C., Hars, J., Leparç-Goffart, I., L'Ambert, G., Paty, M.-C., Cavalerie, L., Daix, C., Tritz, P., Durand, B., Zientara, S., Lecollinet, S., 2016. West Nile virus epizootics in Camargue, France, in 2015, and reinforcement of West Nile virus surveillance and control networks. *OIE Bulletin* 1.
- Beasley, D.W., Whiteman, M.C., Zhang S., Huang, C.Y., Schneider, B.S., Smith, D.R., Gromowski, G.D., Higgs, S., Kinney, R.M., Barrett, A.D., 2005. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology* 79, 8339-8347.
- Brault, A.C., Huang, C.Y., Langevin, S.A., Kinney, R.M., Bowen, R.A., Ramey, W.N., Panella, N.A., Holmes, E.C., Powers, A.M., Miller, B.R., 2007. A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nature genetics* 39, 1162-1166.
- Capelli, G., Ravagnan, S., Montarsi, F., Fabrizio, S., Cazzin, S., Bonfanti, L., Di Gennaro, A., Portanti, O., Mulatti, P., Monne, I., Cattoli, G., Cester, G., Russo, F., Savini, G., Marangon, S., 2013. Further evidence of lineage 2 West Nile Virus in *Culex pipiens* of North-Eastern Italy. *Vet Ital* 49, 263-268.
- Chernov, A.V., Shiryayev, S.A., Aleshin, A.E., Ratnikov, B.I., Smith, J.W., Liddington, R.C., Strongin, A.Y., 2008. The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the West Nile virus NS3 helicase. *The Journal of biological chemistry* 283, 17270-17278.
- Deas, T.S., Binduga-Gajewska, I., Tilgner, M., Ren, P., Stein, D.A., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Kauffman, E.B., Kramer, L.D., Shi, P.Y., 2005. Inhibition of flavivirus infections by antisense oligomers specifically suppressing viral translation and RNA replication. *Journal of virology* 79, 4599-4609.
- Dridi, M., Rauw, F., Muylkens, B., Lecollinet, S., van den Berg, T., Lambrecht, B., 2013a. Setting up a SPF chicken model for the pathotyping of West Nile virus (WNV) strains. *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 2, 51-62.
- Dridi, M., Vangeluwe, D., Lecollinet, S., van den Berg, T., Lambrecht, B., 2013b. Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains. *Veterinary microbiology* 165, 160-166.

- Ebel, G.D., Fitzpatrick, K.A., Lim, P.Y., Bennett, C.J., Deardorff, E.R., Jerzak, G.V., Kramer, L.D., Zhou, Y., Shi, P.Y., Bernard, K.A., 2011. Nonconsensus West Nile virus genomes arising during mosquito infection suppress pathogenesis and modulate virus fitness in vivo. *Journal of virology* 85, 12605-12613.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M., 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic acids research* 17, 4713-4730.
- Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S.P., O'Leary, D.R., Campbell, G.L., 2005. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerging infectious diseases* 11, 1167-1173.
- Kummerer, B.M., Rice, C.M., 2002. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *Journal of virology* 76, 4773-4784.
- Langevin, S.A., Bowen, R.A., Reisen, W.K., Andrade, C.C., Ramey, W.N., Maharaj, P.D., Anishchenko, M., Kenney, J.L., Duggal, N.K., Romo, H., Bera, A.K., Sanders, T.A., Bosco-Lauth, A., Smith, J.L., Kuhn, R., Brault, A.C., 2014. Host competence and helicase activity differences exhibited by West Nile viral variants expressing NS3-249 amino acid polymorphisms. *PloS one* 9, e100802.
- Liu, W.J., Chen, H.B., Khromykh, A.A., 2003. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *Journal of virology* 77, 7804-7813.
- Liu, W.J., Wang, X.J., Mokhonov, V.V., Shi, P.Y., Randall, R., Khromykh, A.A., 2005. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. *Journal of virology* 79, 1934-1942.
- Malkinson, M., Banet, C., Weisman, Y., Pokamunski, S., King, R., Drouet, M.T., Deubel, V., 2002. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerging infectious diseases* 8, 392-397.
- Munoz-Jordan, J.L., Sanchez-Burgos, G.G., Laurent-Rolle, M., Garcia-Sastre, A., 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 14333-14338.
- Murray, K.O., Mertens, E., Despres, P., 2010. West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Veterinary research* 41, 67.
- Papa, A., Danis, K., Baka, A., Bakas, A., Dougas, G., Lytras, T., Theocharopoulos, G., Chrysagis, D., Vassiliadou, E., Kamaria, F., Liona, A., Mellou, K., Saroglou, G., Panagiotopoulos, T., 2010. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July-August 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 15.
- Prow, N.A., Setoh, Y.X., Biron, R.M., Sester, D.P., Kim, K.S., Hobson-Peters, J., Hall, R.A., Bielefeldt-Ohmann, H., 2014. The West Nile virus-like flavivirus Koutango is highly virulent in mice due

to delayed viral clearance and the induction of a poor neutralizing antibody response. *Journal of virology* 88, 9947-9962.

Pugachev, K.V., Guirakhoo, F., Ocran, S.W., Mitchell, F., Parsons, M., Penal, C., Girakhoo, S., Pougatcheva, S.O., Arroyo, J., Trent, D.W., Monath, T.P., 2004. High fidelity of yellow fever virus RNA polymerase. *Journal of virology* 78, 1032-1038.

Puig-Basagoiti, F., Tilgner, M., Bennett, C.J., Zhou, Y., Munoz-Jordan, J.L., Garcia-Sastre, A., Bernard, K.A., Shi, P.Y., 2007. A mouse cell-adapted NS4B mutation attenuates West Nile virus RNA synthesis. *Virology* 361, 229-241.

Samuel, M.A., Diamond, M.S., 2006. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *Journal of virology* 80, 9349-9360.

Shi, P.Y., Tilgner, M., Lo, M.K., Kent, K.A., Bernard, K.A., 2002. Infectious cDNA clone of the epidemic west nile virus from New York City. *Journal of virology* 76, 5847-5856.

Smithburn, K., Hughes, T., Burke, A., Paul, J., 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg* 20, 471-492.

Sotelo, E., Fernandez-Pinero, J., Llorente, F., Agüero, M., Hoefle, U., Blanco, J.M., Jimenez-Clavero, M.A., 2009. Characterization of West Nile virus isolates from Spain: new insights into the distinct West Nile virus eco-epidemiology in the Western Mediterranean. *Virology* 395, 289-297.

Valiakos, G., Papaspyropoulos, K., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Tsiodras, S., Hutchings, M.R., Spyrou, V., Pervanidou, D., Athanasiou, L.V., Papadopoulos, N., Tsokana, C., Baka, A., Manolakou, K., Chatzopoulos, D., Artois, M., Yon, L., Hannant, D., Petrovska, L., Hadjichristodoulou, C., Billinis, C., 2014. Use of wild bird surveillance, human case data and GIS spatial analysis for predicting spatial distributions of West Nile virus in Greece. *PLoS one* 9, e96935.

3.2. Discussion de la partie 3

Lors de cette troisième partie, nous nous sommes intéressés à la protéine NS3 et plus particulièrement au résidu NS3-249, pour lequel plusieurs études tendent à montrer le rôle de la présence d'un résidu Proline, comme déterminant majeur d'une virulence augmentée notamment chez les modèles aviaires. Au contraire, l'impact d'une mutation NS3-249P ne penche pas systématiquement en faveur d'un phénotype plus virulent chez l'hôte mammifère. Aussi, aucune donnée *in vivo* concernant le rôle de cette mutation dans la compétence vectorielle du moustique n'était disponible dans la littérature. Nous avons choisi d'évaluer le mutant simple NS3-P249T, potentiellement atténué, chez la Corneille Noire, la souris BALB/cByJ ainsi que le *Culex pipiens*.

Les résultats obtenus confirment la capacité de la mutation NS3-P249T à conduire à un phénotype atténué chez la Corneille Noire. Aussi, concernant l'étude chez la souris BALB/cByJ, l'infection par voie intrapéritonéale de la souche WTPro (NS3-249P) et de la souche MutThr (NS3-249T) montrent une mortalité significativement plus faible dans le cas de la souche NS3-249T après une inoculation de 10 PFU ($p < 0,05$) ou 10^2 PFU ($p < 0,01$). Enfin, les résultats obtenus après gorgement de *Culex pipiens* avec 10^7 TCID₅₀/mL de chacune des souches, n'ont pas montré de différence en termes de pourcentage d'infection, de dissémination ou de transmission. Néanmoins, le pourcentage de moustiques infectés présentant du virus dans leur salive après 14 jours d'incubation, semble plus faible après infection par la souche NS3-249T. L'absence de données significatives à ce niveau pourrait être due à un effectif trop faible. Nous avons donc montré que la souche NS3-249T semble limiter le passage du virus dans les glandes salivaires du moustique, impactant possiblement la compétence vectorielle, mais que l'affirmation de cette observation devra être complétée par de nouvelles analyses.

Enfin, le domaine N-terminal de la protéine NS3 est particulièrement impliqué dans la fonction protéase de la protéine notamment pour le clivage des jonctions NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A et NS4B/NS5. La partie C-terminale comporte la fonction hélicase et RNA triphosphatase de la protéine NS3 impliquées dans la réplication et la synthèse de l'ARN. Au niveau structural, la modification d'une Proline en Thréonine, abolit la présence d'un coude (dû à la Proline). Il est possible que cette modification structurale impact la fonction hélicasique de la protéine NS3 (Langevin et al. 2014), affectant alors la réplication virale et donc participant à un phénotype atténué dans le cas des souches virales NS3-249T. De nouvelles analyses seraient nécessaires pour valider ou non cette hypothèse.

4. Introduction à la partie 4

La quatrième partie consistait à évaluer l'impact des modifications génétiques réalisées lors des Parties 1 et 2, dans la modification de la compétence vectorielle d'espèces de moustiques abondantes retrouvées en Guadeloupe. Une circulation du VWN en Guadeloupe a été mise en évidence pour la première fois en 2002 (Quirin et al. 2004) suite à la détection d'anticorps dans des sérums de chevaux et de poulets sentinelles. Les espèces de moustiques retrouvées à proximités des zones rurales d'élevage des poulets et des chevaux ont été ciblées prioritairement. Il s'agissait de : *Culex atratus* (*Cx. atratus*), *Deinocerites magnus* (*De. Magnus*), *Culex nigripalpus* (*Cx. nigripalpus*), *Ochlerotatus taeniorhynchus* (*Oc. taeniorhynchus*). *Culex quinquefasciatus* constitue une autre espèce décrite en Guadeloupe intéressante pour cette étude, mais associé aux habitats urbains et péri urbains. *Culex quinquefasciatus* est un modèle connu pour l'étude de la transmission vectorielle du VWN (Torres et al. 2022) (Atyame et al. 2019). Sa compétence vectorielle sur différentes aires géographiques a d'ores et déjà été prouvée (Reis et al. 2023), avec peu d'étude sur la compétence vectorielle du moustique *Culex quinquefasciatus* de Guadeloupe (Shi et al. 2022). La récupération des espèces du terrain est fortement impactée par les facteurs climatiques tels que l'humidité, les intempéries, la température ou encore la disponibilité des espèces. Pour cette raison nous nous sommes en priorité focalisés sur deux espèces retrouvées de façon abondante : *Cx. atratus* et *De. Magnus*.

4.1. Partie 4 : recherche d'espèces compétentes pour le virus West Nile en Guadeloupe

4.1.1. Zones de capture

La pose des pièges CDC a été réalisée le soir, à partir de 18h, permettant de limiter l'évaporation de la carboglace utilisée afin d'attirer les moustiques femelles à proximité du piège, dans le but d'imiter le dégagement de CO₂ exercé par un mammifère lors de sa respiration. La récupération des pièges CDC comportant les individus vivants a été réalisée à l'aube, vers 7h du matin.



Figure 36. Réservoir de stockage de moustiques vivants pour piège CDC, réalisation "maison".

Cx. atratus a été récupéré à Petit-Bourg, à proximité de la ferme « TI-BOU » aux coordonnées GPS :16.215373 -61.594420, dans une zone naturelle que nous avons qualifiée de « forêt marécageuse ». *De. magnus* a été capturé à Baie-Mahault, sur deux sites espacés d'une centaine de mètre aux coordonnées : 16.284441 - 61.566467 et 16.284384 -61.567750 dans une zone naturelle qualifiée de « mangrove ».



Figure 37. Zone de capture, mangrove de Baie-Mahault.

4.1.2. Méthodologie d'infection

Après avoir récupéré les espèces sur les zones de capture du terrain, il est nécessaire d'opérer un tri entre les individus collectés afin de ne sélectionner que les espèces d'intérêt. Le tri s'est effectué sous loupe binoculaire, après un endormissement de maximum 3 minutes via une plaque diffusant du CO₂. L'identification des espèces a été permise en se basant sur la « Clé d'identification des espèces de Guadeloupe » (Annexe 16). Après identification, les individus ont été placés, par groupe de 50 dans des petites boîtes en plastiques, couverte d'une fine grille métallique permettant le passage du proboscis de la femelle moustique au moment du gorgement (Fig.). Suite à cela, les individus ont été stockés 1 jour en insectarium dans un laboratoire confiné de niveau 2. En l'absence d'enceinte climatique nous les avons maintenus dans une cuve en plexi glace, dont le fond était couvert d'eau, afin de maintenir une humidité proche de 80%. La pièce était maintenue à 28°C.

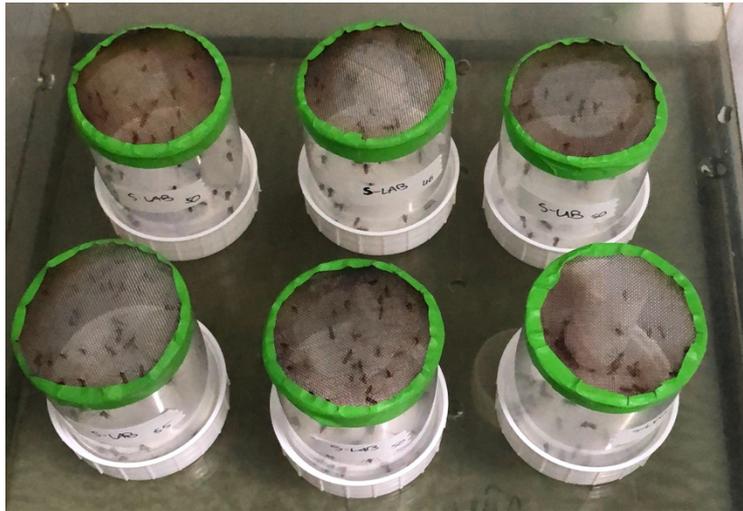


Figure 38. Pots renfermant les moustiques femelles triées, CIRAD, CRVC.

Contrairement aux espèces adaptées au laboratoire, comme le *Cx. quinquefasciatus* S-SLAB (Atyame et al. 2019), le temps de jeun d'une espèce retrouvée sur le terrain varie d'une espèce à l'autre, et une étape de mise au point est nécessaire pour évaluer le meilleur temps de jeun, permettant de trouver un compromis intéressant entre le taux de gorgement et l'impact du temps de jeun sur la mortalité et la fragilisation des espèces. Des tests de mise au point nous ont permis de conclure qu'un jeun de 5h était optimal pour *Cx. atratus* tandis qu'un jeun de 10h était optimal pour *De. magnus*.

Après un temps de jeun optimal, les moustiques (*Cx. atratus* ou *De. magnus*) ont été transportés dans le laboratoire BSL-3 juste avant le gorgement. Le gorgement a eu lieu à la tombée de la nuit, afin de ne pas modifier le cycle naturel du moustique. Du sang de cabri frais conservé dans des tubes héparinés, a été utilisé pour les différentes infections de ces espèces. Le gorgement a été effectué via un gorgeur Hemoteck® chauffant le mélange sang/virus à 37°C, chacun des réceptacles sang/virus utilisés contenait du sang de cabri, 10^7 TCID₅₀/mL de virus WN Israël 1998 ainsi que 10^{-3} M d'ATP. Après gorgement, les individus ont été endormis via une plateforme diffusant du CO₂ à la surface des pots. Les moustiques gorgés ont été triés et rassemblés dans le même type de pot. En l'absence d'enceinte climatique, l'incubation a été réalisée dans une cuve en plexi glace contenant de l'eau permettant d'obtenir environ 80% d'humidité, sur la paillasse à 23°C.

Durant 14 jours, les moustiques ont été maintenus dans ces conditions, et nourris avec des cotons imbibés d'eau sucrée (10%), changés tous les deux jours. Au terme de l'incubation, les moustiques vivants ont été disséqués. Des titrages par méthode TCID₅₀ ont été réalisés sur les broyats d'abdomens, permettant d'estimer l'infection, puis sur les broyats de pattes et la salive dans le cas des moustiques positifs pour l'infection ou dissémination (cf Partie 2).

4.1.3. Résultats préliminaires de l'étude de la compétence vectorielle de *Culex atratus* et de *Deinocerites magnus*

Au total, 88 *Cx. atratus* ont été analysés 14 jours après infection mais aucun n'a présenté du virus infectieux dans son abdomen. Concernant les *De. magnus*, 99 individus ont été disséqués et analysés 14 jours après infection, seul un des individus a présenté du virus infectieux, titré à $5,00 \times 10^4$ TCID₅₀/mL, mais aucun n'a présenté du virus infectieux dans les pattes/ailes ou dans la salive, suggérant un faible taux d'infection et une absence de dissémination dans cette espèce.

4.2. Conclusion sur la partie 4

Les analyses menées sur les espèces de moustiques n'ont pu aboutir, suite à différentes contraintes. Une des difficultés de l'étude de la compétence vectorielle de moustiques retrouvés sur le terrain est la disponibilité des espèces, ainsi que leur potentielle fragilité. De plus l'adaptation au laboratoire BSL-3, maintenu en dépression, est sans aucun doute un des facteur limitant la survie des espèces avant infection. De plus, l'endormissement répété (même contrôlé en temps) afin d'effectuer les différents tris, impacte de nouveau la sensibilité des espèces. Aussi l'élaboration d'un temps de jeun optimal nécessite beaucoup de mises au point.

Pour l'heure aucune publication ne renseigne sur la possibilité de la compétence vectorielle de *Cx. atratus* ou *De. magnus*, vis-à-vis du VWN ou de tout autre *flavivirus*. Pour différentes raisons, dont celles énoncées précédemment, l'identification d'une espèce vectrice du VWN parmi les espèces sélectionnées en Guadeloupe n'a donc pas pu aboutir, ne permettant pas d'apporter de nouvelles données sur ce sujet ; de nouvelles investigations seraient nécessaires.

IV. Discussion générale & perspectives

Le VWN est un *flavivirus* neurotrope retrouvé sur l'ensemble du globe excepté l'Antarctique. Comme de nombreux virus, tel que le virus ZIKA (Talero-Gutiérrez et al. 2018), le VWN a été découvert pour la première fois en Afrique, et particulièrement en Ouganda (Smithburn et al. 1940). Ce virus constitue actuellement un problème en santé publique et en santé vétérinaire. Le VWN se transmet dans un cycle faisant intervenir les oiseaux comme hôtes amplificateurs et les moustiques, principalement du genre *Culex* comme vecteurs. Les espèces mammifères dont l'Homme et les chevaux sont des hôtes accidentels, cul de sac épidémiologiques puisqu'ils ne développent pas une virémie suffisante permettant à un nouveau moustique de s'infecter lors d'un repas sanguin.

A la suite d'une forte épidémie à New York en 1999, le virus s'est largement dispersé sur le continent américain en une dizaine d'années (Komar 2003) avec des formes neurologiques rapportées dans l'avifaune, dans les populations équine et humaine. L'épidémiologie du virus en Europe est quant à elle différente. Les circulations du VWN s'exerçaient de façon épidémique et étaient limitées géographiquement avec une ré-émergence du virus identifiée à la fin des années 1990 en Roumanie et en Italie. Depuis 2004, plusieurs événements ont montré une endémisation du virus sur le continent Européen notamment due à l'émergence de souches de lignée 2 en Autriche à partir de 2004 (Bakonyi et al. 2013) (Papa et al. 2011) (Calistri et al. 2010). L'Europe a particulièrement été marquée par une épidémie de grande envergure entraînant des cas d'infection records rapportés chez l'Homme, dans l'avifaune et chez les chevaux en 2018 (Martin and Simonin 2019) ainsi que plus récemment en 2022 (Barzon, Montarsi, et al. 2022).

L'occurrence et l'intensité des épidémies sont directement liées à la densité des espèces aviaires et moustiques ainsi qu'à la probabilité qu'un vecteur compétent puisse rencontrer un hôte présentant une virémie élevée, avant d'être lui-même de nouveau utilisé par un vecteur lors d'un repas sanguin. La dispersion rapide du VWN à travers le globe est corrélée à plusieurs facteurs écologiques influençant la répartition des espèces, tels que le réchauffement climatique lui-même impliqué dans le changement des zones d'habitats de certaines espèces comme les oiseaux, ou les moustiques (Hussain and Dhiman 2022). En dehors des variables écologiques, la distribution du VWN est également due aux différentes pressions de sélection qui s'exercent sur le génome viral.

L'identification et la compréhension du rôle des déterminants moléculaires de virulence dans chacun des compartiments du cycle de transmission du virus est donc un enjeu de taille permettant d'anticiper l'intensité des futures épidémies, dans le but de mieux s'y préparer. Cela est également un point de départ essentiel dans la proposition de nouvelles solutions vaccinales.

Au vu des données disponibles dans la littérature se concentrant principalement sur des isolats américains, australiens et africains, il nous a semblé indispensable de compléter et élargir nos connaissances sur les facteurs moléculaires viraux spécifiques aux souches circulantes européennes permettant d'expliquer les différences de pathogénicité observées chez l'Homme, l'oiseau et le cheval.

Pour répondre à cet objectif nous avons décidé de considérer deux souches de VWN lignée 1 dont la différence de virulence a non seulement été établie dans la nature mais également lors d'expérimentations en laboratoire (Dridi et al. 2013). La souche WNV Israël 1998 est une souche virulente responsable de nombreuses formes neuro-invasives chez l'homme, dans l'avifaune et chez les équidés, tandis que la souche WNV Italie 2008 est une souche faiblement pathogène (ce qui a notamment été observé dans un modèle aviaire (Dridi et al. 2013)).

Nous avons utilisé les outils de biologie moléculaire performants dont notamment deux techniques de génétique inverse, l'une basée sur l'utilisation de clone infectieux WNV et l'autre correspondant à la technique ISA pour répondre à notre objectif. Les outils de génétique inverse sont disponibles depuis 1989, notamment grâce à l'étude du génome du virus de la fièvre jaune (YFV). Leur évolution au fil des années, a permis de simplifier l'étude des marqueurs de virulence des agents pathogènes d'intérêt en santé publique et vétérinaire.

Nos travaux se sont articulés autour de quatre grandes parties.

La Partie 1 consiste en l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de chimères réalisées entre la souche Israël 1998 et Italie 2008, chez un modèle mammifère (cellules Vero, souris BALB/cByJ) ou aviaire (cellules CCL141, poulet SPF). Les résultats obtenus ont montré l'importance de la région NS4A/NS4B/5'NS5 dans la virulence chez un hôte aviaire tandis que la région NS5/3'UTR semble particulièrement impliquées dans l'atténuation du phénotype dans un modèle mammifère. La comparaison de la région NS4A/NS4B/5'NS5 du virus WNV Israël 1998 avec la même séquence chez le virus WNV Italie 2008, renferme plusieurs mutations non-synonymes dont les rôles spécifiques dans la virulence et la pathogénicité du virus restent à caractériser. Il s'agit des mutations suivantes : NS4A-A81I, NS4A-P100S, NS4B-E249D, NS5-H53Y et NS5-S54P. Ces modifications non-synonymes sont de bons candidats pouvant expliquer l'acquisition d'un phénotype atténué de la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 et plus largement de la souche parentale Italie 2008 chez le poulet SPF. La région NS5/3'UTR de la chimère IS98-NS5/3'UTR renferme quant à elle six mutations non-synonymes : NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V et NS5-R422K ; ainsi que 21 (sur 25 au total) mutations dans la partie 3'UTR : 3'UTR-T10402C, 3'UTR-A10405T, 3'UTR-T10425C, 3'UTR-C10435T, 3'UTR-A10439T, 3'UTR-A10441G, 3'UTR-G10444A, 3'UTR-T10448G, 3'UTR-A10457G, 3'UTR-T10459C, 3'UTR-G10465A, 3'UTR-G10467T, 3'UTR-G10468A, 3'UTR-G10498A, 3'UTR-A10504G, 3'UTR-G10517A, 3'UTR-G10520A, 3'UTR-C10523T, 3'UTR-T10689C, 3'UTR-C10721T et 3'UTR-C10775T. La protéine NS5 est la protéine non-structurale la plus conservée chez les flavivirus, et possède des domaines précis, tels que le domaine K-D-K-E ou le motif PBM (PDZ-Binding Motif) connus comme impliqués dans la réplication virale (Züst et al. 2018) (Zhou et al. 2007) ou encore une phosphorylation sur la Thr449 (chez les virus DENV ou TBEV) (Morozova et al. 1997) (Reed, Gorbalenya, and Rice 1998). Toutefois, l'ensemble des mutations identifiées ci-dessus, n'interviennent pas dans ces domaines précis ce qui nous amène à proposer ces modifications comme de possibles nouveaux déterminants moléculaires de virulence du VWN.

Parmi la diversité des mutations soulevées comme potentiellement importantes chez l'hôte mammifère ou aviaire, la mutation NS4B-E259G, présente sur la souche atténuée Texas 2003 est d'ores et déjà connue dans

la littérature comme impliquée dans l'atténuation de la virulence, notamment chez l'hôte mammifère (Puig-Basagoiti et al. 2007) mais également dans l'avifaune (Davis et al. 2004). Cette mutation est donc un bon candidat permettant d'expliquer l'atténuation de la virulence de la chimère IS98-NS4A/NS4B/5'NS5 et la souche parentale Italie 2008 dans un modèle aviaire.

Nous nous sommes également intéressés à la mutation NS3-P249T, déterminant moléculaire de virulence décrit comme impliqué dans un phénotype atténué chez l'oiseau uniquement (Brault et al. 2007) (Langevin, Bowen, and Reisen 2014). En effet, le rôle de cette mutation comme déterminant moléculaire de virulence chez l'hôte mammifère est controversé. Langevin *et al.* (Langevin, Bowen, and Reisen 2014) n'ont pas remarqué de différence de virulence chez la souris CD-1 infectée par un isolat portant cette mutation alors que Sotelo *et al.* (Sotelo et al. 2009) montrent que la mutation NS3-P249T induirait un phénotype plus virulent chez la souris. Nos résultats montrent une différence dans la virulence chez la souris tandis que cela n'avait pas été montré par l'équipe du Dr Langevin.

Afin de compléter l'identification des facteurs viraux impliqués dans les différences de virulence et de pathogénicité associée aux souches européennes circulantes chez l'hôte mammifère et invertébré, nous avons généré six virus chimériques à l'aide de la technique de génétique inverse ISA (différente de celle utilisée au cours de la première partie de cette thèse) en échangeant des régions génomiques homologues entre les deux souches parentales, le génome de WNV Israël 1998 ayant servi de « squelette ». Nous nous sommes concentrés sur les différentes régions génomiques codant pour les protéines NS et les régions 3'UTR et 5'UTR.

Nous avons mis en évidence le rôle incontestable de la région non codante 3'UTR et des protéines 3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B dans l'acquisition du phénotype atténué des virus chimériques IS98 pour lesquels cette portion du génome est interchangeée *in vitro* sur cellules Véro et C6/36 ainsi qu'*in vivo* en modèles murin et invertébré. Le séquençage sans à priori *IonTorrent* a permis de montrer que la chimère IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B présente quatre mutations non-synonymes (Annexe 9) attendues : NS3-P496L, NS3-E521D, NS4A-A85I et NS4A-P100S ainsi que deux mutations non attendues : NS1-N207I et NS5-S54P. La mutation NS1-N207I n'est pas présente sur le génome Italie 2008 et pourrait être due à une erreur de la polymérase *SuperFi* utilisée lors de la génération des fragments de PCR utilisés pour produire les virus chimériques par la méthode ISA, de plus elle est d'ores et déjà connue comme impliquée dans un motif de glycosylation et impactant la virulence chez le mammifère (Fiacre et al. 2020). Au contraire, la mutation NS5-S54P existe sur le génome de WNV Italie 2008 et pourrait être due à la présence de quasi-espèces au sein de notre population de virus chimériques. Nous avons identifié l'ensemble de ces six mutations, comme de potentiels nouveaux marqueurs moléculaires de virulence. Aussi, la première partie avait permis de souligner que les régions NS4A/NS4B/5'NS5 n'influençaient pas la virulence dans un modèle mammifère, or lors de cette deuxième partie nous avons remarqué que l'ajout de la protéine NS3 diminue la virulence chez les souris BALB/cByJ. La fonction hélicase de la protéine NS3 (Zhou, Singh, and Kim 2006) (Bollati et al. 2010), notamment au niveau de la région NS3/NS4A pourrait en partie expliquer cette différence, suggérant un rôle

important de l'hélicase NS3 et notamment des résidus NS3-496 et NS3-521 dans la réplication du VWN chez les mammifères.

La compétence vectorielle des moustiques *Culex pipiens* a été évaluée vis-à-vis des 2 souches parentales et des chimères IS98-3'NS4B/NS5, IS98-3'UTR et de IS98-NS3P249P.

De façon surprenante, les souches parentales ne présentent pas de différence significative entre elles, en termes de pourcentage d'infection, de dissémination ou de transmission. Les moustiques *Culex pipiens* présentent donc une compétence vectorielle équivalente au regard de ces deux isolats. Cependant, le pourcentage de moustiques infectés est significativement différent entre d'une part les moustiques infectés par les virus parentaux et d'autre part les moustiques infectés par les virus chimériques. Cela nous amène à suggérer que l'atténuation du taux d'infection par les virus chimériques est dû à des modifications dans l'interaction des régions génomiques notamment au niveau de la région 3'UTR, la partie 3' de la protéine NS4B ou encore la protéine NS5.

Aussi, grâce au séquençage NGS, nous avons remarqué que la chimère IS98-3'UTR, possède des mutations au niveau des nucléotides de la région 3'UTR : nt 10517, nt 10520, nt 10523, nt 10689, nt 10721, nt 10775, nt 10830, nt 10832, nt 10852. La région 3'UTR possède des séquences 3'UAR et 3'CS impliquées dans des interactions avec la partie 5'UTR (Hahn et al. 1987), cependant nous avons vérifié qu'aucun des 9 nucléotides énoncés précédemment n'intervient dans ces interactions, ce qui suggère que ces nucléotides pourraient être impliqués dans des interactions pour l'heure non identifiées. Le séquençage *IonTorrent* de la chimère IS98-3'UTR a également permis d'identifier les mutations NS4B-C120F et NS5-N867N dans la construction. Là encore, nous pouvons supposer que la mutation NS4B-C120F pourrait faire suite à une erreur de polymérase tandis que la mutation NS5-N867N, non attendue dans cette construction mais présente sur le génome Italie 2008, pourrait être le reflet de quasi-espèces.

De façon intéressante, la chimère IS98-3'NS4B/NS5 présentait également une diminution dans le taux d'infection chez *Culex pipiens* par rapport aux virus parentaux, mais surtout une augmentation significative de l'efficacité de dissémination, comparativement aux trois autres virus. La chimère IS98-3'NS4B/NS5 présente sept mutations non synonymes, retrouvées sur le génome de la souche parentale Italie 2008 : NS4B-E249D, NS5-H53Y, NS5-S54P, NS5-V258A, NS5-N280K, NS5-A372V et NS5-R422K. Là encore, parmi ces mutations, celle au niveau du nucléotide NS4B-249 a déjà montré un rôle dans la virulence chez l'oiseau (Davis et al. 2004) ou dans un modèle mammifère (Puig-Basagoiti et al. 2007), Ainsi que chez le poulet SPF comme montré dans la première partie de notre travail ; cette mutation a également déjà été montrée comme impliquée (conjointement avec d'autres mutations) dans l'atténuation de la compétence vectorielle chez *Culex tarsalis* (Van Slyke et al. 2013). Ici nous suggérons un rôle de la mutation NS4B-E249D dans l'induction du passage du virus à travers la barrière intestinale du vecteur. L'infection de *Culex pipiens* par IS98-NS3P249T n'a quant à elle pas présenté de différence significative que ce soit dans le taux d'infection, l'efficacité de dissémination ou de transmission. Toutefois, la transmission présente une tendance à être plus faible lorsque le moustique a ingéré le mutant dans son repas sanguin. La compétence vectorielle est une donnée relativement complexe à

analyser, tant elle peut être minime et nécessiter de grands effectifs. Des analyses plus poussées pourraient être réalisées chez *Culex pipiens* afin de renforcer ces premières données établies.

Les abdomens des moustiques infectés par le mutant NS3-P249T, et présentant des profils d'infection différents (infection/Infection+dissémination/Infection/dissémination+transmission) ont été envoyés pour des analyses RNAseq à la plateforme MGX dans le but de mieux caractériser les différences dans l'induction des gènes selon le profil de réplication, via des analyses de RNAseq. Cela permettrait de mieux comprendre les gènes impliqués par exemple dans le passage du virus au niveau de la barrière intestinale ou dans les glandes salivaires. Le traitement des échantillons est en cours par la plateforme.

Un dernier volet de ces travaux de thèse consistait à évaluer l'impact des modifications chimériques identifiées dans les parties 1 et 2, dans la modification de la compétence vectorielle d'espèces de moustiques du terrain retrouvées en Guadeloupe. Plusieurs espèces abondantes sont retrouvées en Guadeloupe selon les saisons, comme *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. atratus*, *Cx. nigripalpus*, *Oc. taeniorhynchus*, *Ae. aegypti* ou *De. magnus*. La circulation du VWN en Guadeloupe a été identifiée pour la première fois en 2002 via des tests de compétition ELISA réalisés sur le sérum de chevaux et poulets sentinelles (Quirin et al. 2004). En dehors de plusieurs épisodes de circulation du virus sur 2002-2012, aucune épidémie au virus n'a été recensée. L'étude de l'impact des modifications chimériques sur la compétence vectorielle des virus de Guadeloupe a donc débuté en réalisant des gorgements en laboratoire, de *Denocerites magnus* et *Culex atratus*, deux espèces abondantes retrouvées à proximité des zones d'élevage des animaux sentinelles. Bien que le gorgement en laboratoire BSL3 d'espèces de terrain fragilisées ait été particulièrement difficile à implémenter en insectarium BSL3, nous avons obtenus quelques résultats préliminaires. L'infection d'une centaine de *Culex atratus* et leur maintien 14 jours en conditions non-optimales après infection (23°C, moins de 80% d'humidité) n'ont pas permis d'identifier des moustiques infectieux au terme de l'expérimentation. En revanche, du virus infectieux a été retrouvé ($5,00 \times 10^4$ TCID₅₀/mL) chez un des individus *Denocerites magnus*. L'étude des espèces vectrices du VWN en Guadeloupe est donc à poursuivre et pourrait permettre de mettre en lumière de nouvelles espèces vectrices du VWN, aidant possiblement à mieux comprendre les rares cas de circulation du virus sur l'île.

Plus généralement ces différentes parties nous ont permis de mettre en lumière un rôle important des protéines non-structurales, notamment NS3/NS4A/NS4B/NS5 dans la modification de la virulence d'isolats WNV ayant circulés en Europe chez des hôtes aviaires ou mammifères et dans l'infection du *Culex pipiens*. L'avantage de l'utilisation de chimères dans la compréhension des mécanismes de virulence ou de compétence vectorielle est que cela permet d'appréhender l'interaction protéine-protéine. En revanche, de telles études amènent à proposer un nombre important de potentiels résidus candidats impliqués dans les modifications de la virulence des souches WNV lignée 1 européenne. Nous pourrions envisager de réaliser des mutations simples par mutagenèse dirigée, au niveau des potentiels acteurs de la virulence/compétence vectorielle identifiés. Les fragments considérés dans l'établissement de nos chimères restent relativement longs, et il serait intéressant de procéder à

des chimères impliquant des fragments plus petits, afin de resserrer la zone d'intérêt à étudier. Cependant, l'utilisation de la technique ISA bien que plus rapide qu'une méthode classique de génétique inverse, revêt certaines contraintes telles que le nombre ou la taille de fragments. L'établissement de nouvelles chimères devrait donc tenir compte de ces prérequis. Comme montré précédemment cette technique peut également être responsable de l'apparition de mutations non désirées, à prendre en compte dans les interprétations.

Ces travaux nous ont permis d'étudier l'ensemble du génome du VWN chez ses hôtes mammifères, aviaire ou encore chez son vecteur moustique. La difficulté de la compréhension des déterminants moléculaires de virulence réside dans le fait que ces derniers agissent souvent de concert, et ne sont que très rarement localisés en un seul résidu. La diversité des ressources disponibles, telles que l'infection *in vivo* en laboratoire BSL3 de souris BALB/cByJ, d'oiseaux, ou encore le gorgement de *Culex pipiens*, ont permis d'enrichir les connaissances concernant les régions potentiellement impliquées dans la modification de la virulence du VWN, révélant un intérêt marqué pour les protéines non-structurales de la NS3 à la protéine NS5. Le séquençage haut débit par la méthode *IonTorrent* nous a permis de proposer de nouveaux résidus comme facteurs moléculaires de la virulence du VWN, et de renforcer les connaissances vis-à-vis de facteurs déjà connus dans la littérature telle que l'importance du résidu NS4B-249. Ces résultats participent à la compréhension du cycle de transmission du virus chez ses différents hôtes et son vecteur principal *Culex*.

Au-delà de la génération de nouvelles chimères impliquant des régions plus courtes pour préciser nos observations, ou encore l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des chimères « inverses » sur différents modèles, comme proposé précédemment, la compréhension des facteurs de virulence bénéficierait d'études plus poussées notamment via le gorgement de *Culex*. La plupart des déterminants moléculaires connus à ce jour ont été identifiés chez les hôtes mammifères ou aviaires (Fiacre et al. 2020). Il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces déterminants de virulence connus pour leur rôle dans la réplication chez le mammifère, dans la compétence vectorielle, notamment en s'intéressant de plus près aux mutations prM-N15Q, M-I36F, M-A43G, E-154/156 NYS>NYP, NS1-N130A, NS1-N175A, NS1-N207A, NS3del483, NS4A-F92L, NS5-K61A, NS5-K182A, NS5-E218A, NS5-A804V, 3'UTR-A10596G, 3'UTR-C10774U ou encore 3'UTR-A10799G.

V. Références

- Afonso, Vicente, Ozden, Prevost, Schmitt, Seilhean, Weksler, Couraud, Gessain, Andres Romero, and Ceccaldi. 2007. "Human Blood-Brain Barrier Disruption by Retroviral-Infected Lymphocytes: Role of Myosin Light Chain Kinase in Endothelial Tight-Junction Disorganization." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (4): 2576–83. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2576>.
- Ahlers, and Goodman. 2018. "The Immune Responses of the Animal Host of West Nile Virus: A Comparison of Insect, Birds and Mammals." *Front Cell Infect Microbiol.* 2018 Apr 3;(8):96. doi: 10.3389/fcimb.2018.00096. eCollection 2018.
- Akira, Shizuo, Satoshi Uematsu, and Osamu Takeuchi. 2006. "Pathogen Recognition and Innate Immunity." *Cell* 124 (4): 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.
- Alsaleh, Khou, Frenkiel, Lecollinet, Vázquez, Ramírez de Arellano, Després, and Pardigon. 2016. "The E Glycoprotein Plays an Essential Role in the High Pathogenicity of European-Mediterranean IS98 Strain of West Nile Virus." *Virology* 492 (May): 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.009>.
- Amulic, Boriko, Cazalet, Hayes, Metzler, and Zychlinsky. 2012. "Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease." *Annual Review of Immunology* 30: 459–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942>.
- Andervont. 1946. "The Mammary Tumor Agent and Its Implication in Cancer Research." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 18 (5): 333–44.
- Andreadis, Anderson, and Vossbrinck. 2001. "Mosquito Surveillance for West Nile Virus in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex Pipiens*, *Cx. Restuans*, *Cx. Salinarius*, and *Culiseta Melanura*." *Emerging Infectious Diseases* 7 (4): 670–74. <https://doi.org/10.3201/eid0704.010413>.
- Angenvoort, Brault, Bowen, and Groschup. 2013. "West Nile Viral Infection of Equids." *Veterinary Microbiology* 167 (1–2): 168–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.013>.
- Ariel, Stock, Gelb, Pasternak, Ben-Zvi, and Putterman. 2017. "The Blood Brain Barrier and Neuropsychiatric Lupus." *Autoimmunity Reviews* 16 (6): 612–19. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.04.008>.
- Arjona, Alvaro, Harald . Foellmer, Town, Leng, McDonald, Wang, Susan . Wong, Ruth . Montgomery, Fikrig, and Bucala. 2007. "Abrogation of Macrophage Migration Inhibitory Factor Decreases West Nile Virus Lethality by Limiting Viral Neuroinvasion." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (10): 3059–66. <https://doi.org/10.1172/JCI32218>.
- Arragain, Dupont-Rouzeyrol, O'Connor, Sigur, J Grangeon, Huguon, Dechanet, Cazorla, Gourinat, and Descloux. 2017. "Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data." *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* 6 (4): 324–31. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw058>.
- Arroyo, Juan, Chuck Miller, John Catalan, Gwendolyn A. Myers, Marion S. Ratterree, Dennis W. Trent, and Thomas P. Monath. 2004. "ChimeriVax-West Nile Virus Live-Attenuated Vaccine: Preclinical Evaluation of Safety, Immunogenicity, and Efficacy." *Journal of Virology* 78 (22): 12497–507. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12497-12507.2004>.
- Aubry, Fabien, Antoine Nougairède, Lauriane de Fabritus, Gilles Querat, Ernest A. Gould, and Xavier de Lamballerie. 2014. "Single-Stranded Positive-Sense RNA Viruses Generated in Days Using Infectious Subgenomic Amplicons." *The Journal of General Virology* 95 (Pt 11): 2462–67. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068023-0>.
- Austad, Steven N. 2011. "Candidate Bird Species for Use in Aging Research." *ILAR Journal* 52 (1): 89–96. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.1.89>.
- Bahri, O., I. Dhifallah, N. Ben Alaya-Bouafif, H. Fekih, J. Gargouri, and H. Triki. 2011. "[Sero-epidemiological study of West Nile virus circulation in human in Tunisia]." *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)* 104 (4): 272–76. <https://doi.org/10.1007/s13149-010-0100-x>.

Bahuon C. Thèse. Construction d'un clone infectieux d'une souche méditerranéenne du Virus West Nile, validation de ses propriétés biologiques et développement de nouveaux modèles d'évaluation de la virulence. 2012.

Céline Bahuon, Philippe Desprès, Nathalie Pardigon, Jean-Jacques Panthier, Nathalie Cordonnier, Steeve Lowenski, Jennifer Richardson, Stéphan Zientara, Sylvie Lecollinet. 2012. "S-98-ST1 West Nile virus derived from an infectious cDNA clone retains neuroinvasiveness and neurovirulence properties of the original virus". 7(10):e47666. doi: 10.1371/journal.pone.0047666.

Bai, Fengwei, Kok-Fai Kong, Jianfeng Dai, Feng Qian, Lin Zhang, Charles R. Brown, Erol Fikrig, and Ruth R. Montgomery. 2010. "A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus." *The Journal of Infectious Diseases* 202 (12): 1804–12. <https://doi.org/10.1086/657416>.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Cattai M, Cusinato R, Palù G. 2013. "The complex epidemiological scenario of West Nile virus in Italy." *Int J Environ Res Public Health* 10(10):4669-89. doi: 10.3390/ijerph10104669.

Bakhshi, Hasan, Mehdi Fazlalipour, Javad Dadgar-Pakdel, Sedigheh Zakeri, Abbasali Raz, Anna-Bella Failloux, and Navid Dinparast Djadid. 2021. "Developing a Vaccine to Block West Nile Virus Transmission: In Silico Studies, Molecular Characterization, Expression, and Blocking Activity of Culex Pipiens MosGCTL-1." *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (2): 218. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020218>.

Bakonyi, Tamás, Emőke Ferenczi, Károly Erdélyi, Orsolya Kutasi, Tibor Csörgő, Bernhard Seidel, Herbert Weissenböck, Katharina Brugger, Enikő Bán, and Norbert Nowotny. 2013. "Explosive Spread of a Neuroinvasive Lineage 2 West Nile Virus in Central Europe, 2008/2009." *Veterinary Microbiology* 165 (1–2): 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>.

Bakonyi, Tamás, Gyula K. Gajdon, Raoul Schwing, Wolfgang Vogl, Annett-Carolin Häbich, Denise Thaller, Herbert Weissenböck, Ivo Rudolf, Zdenek Hubálek, and Norbert Nowotny. 2016. "Chronic West Nile Virus Infection in Kea (Nestor Notabilis)." *Veterinary Microbiology* 183 (February): 135–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.012>.

Bakonyi, Tamás, Zdenek Hubálek, Ivo Rudolf, and Norbert Nowotny. 2005. "Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe." *Emerging Infectious Diseases* 11 (2): 225–31. <https://doi.org/10.3201/eid1102.041028>.

Banks, William A., Brie Terrell, Susan A. Farr, Sandra M. Robinson, Naoko Nonaka, and John E. Morley. 2002. "Passage of Amyloid Beta Protein Antibody across the Blood-Brain Barrier in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Peptides* 23 (12): 2223–26. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(02\)00261-9](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(02)00261-9).

Baqar, S., C. G. Hayes, J. R. Murphy, and D. M. Watts. 1993. "Vertical Transmission of West Nile Virus by Culex and Aedes Species Mosquitoes." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48 (6): 757–62. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.757>.

Barbachano-Guerrero, Arturo, Antonio Acini Vásquez-Aguilar, A. Alonso Aguirre, Alan A. Zavala-Norzagaray, Eduardo Carrera Gonzalez, Alberto Lafón Terrazas, and José Leopoldo Aguilar- Faisal. 2019. "West Nile Virus Prevalence in Wild Birds from Mexico." *Journal of Wildlife Diseases* 55 (2): 425–31. <https://doi.org/10.7589/2018-03-065>.

Barzon, Luisa, Fabrizio Montarsi, Erika Quaranta, Isabella Monne, Monia Pacenti, Alice Michelutti, Federica Toniolo, et al. 2022. "Early Start of Seasonal Transmission and Co-Circulation of West Nile Virus Lineage 2 and a Newly Introduced Lineage 1 Strain, Northern Italy, June 2022." *Euro Surveill: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 27 (29): 2200548. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.29.2200548>.

Barzon, Luisa, Monia Pacenti, Fabrizio Montarsi, Diletta Fornasiero, Federica Gobbo, Erika Quaranta, Isabella Monne, et al. 2022. "Rapid Spread of a New West Nile Virus Lineage 1 Associated with Increased Risk of Neuroinvasive Disease during a Large Outbreak in Northern Italy, 2022: One Health Analysis." *Journal of Travel Medicine*, November, taac125. <https://doi.org/10.1093/jtm/taac125>.

- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Lavezzo E, Cattai M, Cusinato R, Palù G. The complex epidemiological scenario of West Nile virus in Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Sep 30;10(10):4669-89. doi:10.3390/ijerph10104669.
- Bashirova, A. A., T. B. Geijtenbeek, G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, J. B. Eilering, M. P. Martin, L. Wu, et al. 2001. "A Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3-Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN)-Related Protein Is Highly Expressed on Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Promotes HIV-1 Infection." *The Journal of Experimental Medicine* 193 (6): 671–78. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.671>.
- Bauer, J. H., and N. P. Hudson. 1928. "THE INCUBATION PERIOD OF YELLOW FEVER IN THE MOSQUITO." *The Journal of Experimental Medicine* 48 (1): 147–53. <https://doi.org/10.1084/jem.48.1.147>.
- Beasley, David W. C., Melissa C. Whiteman, Shuliu Zhang, Claire Y.-H. Huang, Bradley S. Schneider, Darci R. Smith, Gregory D. Gromowski, Stephen Higgs, Richard M. Kinney, and Alan D. T. Barrett. 2005. "Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains." *Journal of Virology* 79 (13): 8339–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8339-8347.2005>.
- Bernkopf, H., S. Levine, and R. Nerson. 1953. "Isolation of West Nile Virus in Israel." *The Journal of Infectious Diseases* 93 (3): 207–18. <https://doi.org/10.1093/infdis/93.3.207>.
- Bian, Guowu, Yao Xu, Peng Lu, Yan Xie, and Zhiyong Xi. 2010. "The Endosymbiotic Bacterium Wolbachia Induces Resistance to Dengue Virus in Aedes Aegypti." *PLoS Pathogens* 6 (4): e1000833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>.
- Bidet, Katell, and Mariano A. Garcia-Blanco. 2018. "Flaviviral RNA Structures and Their Role in Replication and Immunity." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1062: 45–62. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_4.
- Bingham, Andrea M., Nathan D. Burkett-Cadena, Hassan K. Hassan, Christopher J. W. McClure, and Thomas R. Unnasch. 2014. "Field Investigations of Winter Transmission of Eastern Equine Encephalitis Virus in Florida." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 91 (4): 685–93. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0081>.
- Biryukova, Inna, Tao Ye, and Elena Levashina. 2014. "Transcriptome-Wide Analysis of MicroRNA Expression in the Malaria Mosquito Anopheles Gambiae." *BMC Genomics* 15 (1): 557. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-557>.
- Bollati, Michela, Karin Alvarez, René Assenberg, Cécile Baronti, Bruno Canard, Shelley Cook, Bruno Coutard, et al. 2010. "Structure and Functionality in Flavivirus NS-Proteins: Perspectives for Drug Design." *Antiviral Research* 87 (2): 125–48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>.
- Bolling, Bethany G., James H. Kennedy, and Earl G. Zimmerman. 2005. "Seasonal Dynamics of Four Potential West Nile Vector Species in North-Central Texas." *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology* 30 (2): 186–94.
- Bondre, Vijay P., R. S. Jadi, A. C. Mishra, P. N. Yergolkar, and V. A. Arankalle. 2007. "West Nile Virus Isolates from India: Evidence for a Distinct Genetic Lineage." *The Journal of General Virology* 88 (Pt 3): 875–84. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82403-0>.
- Brault, Aaron C. 2009. "Changing Patterns of West Nile Virus Transmission: Altered Vector Competence and Host Susceptibility." *Veterinary Research* 40 (2): 43. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009026>.
- Brault, Aaron C, Claire Y-H Huang, Stanley A Langevin, Richard M Kinney, Richard A Bowen, Wanichaya N Ramey, Nicholas A Panella, Edward C Holmes, Ann M Powers, and Barry R Miller. 2007. "A Single Positively Selected West Nile Viral Mutation Confers Increased Virogenesis in American Crows."
- Brennecke, Julius, Alexei A. Aravin, Alexander Stark, Monica Dus, Manolis Kellis, Ravi Sachidanandam, and Gregory J. Hannon. 2007. "Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila." *Cell* 128 (6): 1089–1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>.

- Brien, James D., Jennifer L. Uhrlaub, Alec Hirsch, Clayton A. Wiley, and Janko Nikolich-Zugich. 2009. "Key Role of T Cell Defects in Age-Related Vulnerability to West Nile Virus." *The Journal of Experimental Medicine* 206 (12): 2735–45. <https://doi.org/10.1084/jem.20090222>.
- Briese, T., X. Y. Jia, C. Huang, L. J. Grady, and W. I. Lipkin. 1999. "Identification of a Kunjin/West Nile-like Flavivirus in Brains of Patients with New York Encephalitis." *Lancet (London, England)* 354 (9186): 1261–62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)04576-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)04576-6).
- Brilla, Roland, Margo Block, Glen Geremia, and Melvin Wichter. 2004. "Clinical and Neuroradiologic Features of 39 Consecutive Cases of West Nile Virus Meningoencephalitis." *Journal of the Neurological Sciences* 220 (1–2): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.01.013>.
- Brinton, Margo A. 2013. "Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus." *Viruses* 6 (1): 13–53. <https://doi.org/10.3390/v6010013>.
- Brostoff, Terza, Patricia A. Pesavento, Christopher M. Barker, Joan L. Kenney, Elizabeth A. Dietrich, Nisha K. Duggal, Angela M. Bosco-Lauth, and Aaron C. Brault. 2016. "MicroRNA Reduction of Neuronal West Nile Virus Replication Attenuates and Affords a Protective Immune Response in Mice." *Vaccine* 34 (44): 5366–75. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.063>.
- Bunning, Michel L., Richard A. Bowen, C. Bruce Cropp, Kevin G. Sullivan, Brent S. Davis, Nicholas Komar, Marvin S. Godsey, et al. 2002. "Experimental Infection of Horses with West Nile Virus." *Emerging Infectious Diseases* 8 (4): 380–86. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010239>.
- Burt, Felicity J., Antoinette A. Grobbelaar, Patricia A. Leman, Fiona S. Anthony, Georgina V.F. Gibson, and Robert Swanepoel. 2002. "Phylogenetic Relationships of Southern African West Nile Virus Isolates." *Emerging Infectious Diseases* 8 (8): 820–26. <https://doi.org/10.3201/eid0808.020027>.
- Byas, Alex D., and Gregory D. Ebel. 2020. "Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals." *Pathogens (Basel, Switzerland)* 9 (1): 48. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010048>.
- Byrne, S. N., G. M. Halliday, L. J. Johnston, and N. J. King. 2001. "Interleukin-1beta but Not Tumor Necrosis Factor Is Involved in West Nile Virus-Induced Langerhans Cell Migration from the Skin in C57BL/6 Mice." *The Journal of Investigative Dermatology* 117 (3): 702–9. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01454.x>.
- Calistri, Paolo, Armando Giovannini, Zdenek Hubalek, Aurelia Ionescu, Federica Monaco, Giovanni Savini, and Rossella Lelli. 2010. "Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin." *The Open Virology Journal* 4 (April): 29–37. <https://doi.org/10.2174/1874357901004020029>.
- Campos, Gubio Soares, Antonio Carlos Albuquerque Bandeira, Verônica França Diniz Rocha, Juarez Pereira Dias, Rejane Hughes Carvalho, and Silvia Ines Sardi. 2017. "First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk." *The Pediatric Infectious Disease Journal* 36 (10): 1015–17. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001658>.
- Capelli, Gioia, Silvia Ravagnan, Fabrizio Montarsi, Silvia Fabrizio, Stefania Cazzin, Lebara Bonfanti, Annapia Di Gennaro, et al. 2013. "Further Evidence of Lineage 2 West Nile Virus in Culex Pipiens of North-Eastern Italy." *Veterinaria Italiana* 49 (3): 263–68. <https://doi.org/10.12834/VetIt.1304.02>.
- Castelli, J. C., B. A. Hassel, A. Maran, J. Paranjape, J. A. Hewitt, X. L. Li, Y. T. Hsu, R. H. Silverman, and R. J. Youle. 1998. "The Role of 2'-5' Oligoadenylate-Activated Ribonuclease L in Apoptosis." *Cell Death and Differentiation* 5 (4): 313–20. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400352>.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2002. "Intrauterine West Nile Virus Infection--New York, 2002." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 51 (50): 1135–36.
- Cernescu, C., N. I. Nedelcu, G. Tardei, S. Ruta, and T. F. Tsai. 2000. "Continued Transmission of West Nile Virus to Humans in Southeastern Romania, 1997-1998." *The Journal of Infectious Diseases* 181 (2): 710–12. <https://doi.org/10.1086/315225>.
- Chu, J. J. H., R. Rajamanonmani, J. Li, R. Bhuvanankantham, J. Lescar, and M.-L. Ng. 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): 405–12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80411-0>.

Chung, Kyung Min, M. Kathryn Liszewski, Grant Nybakken, Alan E. Davis, R. Reid Townsend, Daved H. Fremont, John P. Atkinson, and Michael S. Diamond. 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): 19111–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605668103>.

Constant, Oriane, Ghizlane Maarifi, Jonathan Barthelemy, Marie-France Martin, Bachirou Tinto, Giovanni Savini, Philippe Van de Perre, Sébastien Nisole, Yannick Simonin, and Sara Salinas. 2023. “Differential Effects of Usutu and West Nile Viruses on Neuroinflammation, Immune Cell Recruitment and Blood-Brain Barrier Integrity.” *Emerging Microbes & Infections* 12 (1): 2156815. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2156815>.

Courtiade, Juliette, Yannick Pauchet, Heiko Vogel, and David G. Heckel. 2011. “A Comprehensive Characterization of the Caspase Gene Family in Insects from the Order Lepidoptera.” *BMC Genomics* 12 (July): 357. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-357>.

Crockett, Rebekah Kent, Kristen Burkhalter, Daniel Mead, Rosmarie Kelly, Jeffrey Brown, Wendy Varnado, Alma Roy, et al. 2012. “Culex Flavivirus and West Nile Virus in Culex Quinquefasciatus Populations in the Southeastern United States.” *Journal of Medical Entomology* 49 (1): 165–74. <https://doi.org/10.1603/me11080>.

Cullen, Bryan R. 2011. “Viruses and MicroRNAs: RISCy Interactions with Serious Consequences.” *Genes & Development* 25 (18): 1881–94. <https://doi.org/10.1101/gad.17352611>.

Cupp, Eddie W., Hassan K. Hassan, Xin Yue, William K. Oldland, Bruce M. Lilley, and Thomas R. Unnasch. 2007. “West Nile Virus Infection in Mosquitoes in the Mid-South USA, 2002-2005.” *Journal of Medical Entomology* 44 (1): 117–25. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[117:wviiim\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[117:wviiim]2.0.co;2).

Daffis, Stephane, Melanie A. Samuel, Mehul S. Suthar, Michael Gale, and Michael S. Diamond. 2008. “Toll-like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection.” *Journal of Virology* 82 (21): 10349–58. <https://doi.org/10.1128/JVI.00935-08>.

Daffis, Stephane, Kristy J. Szretter, Jill Schriewer, Jianqing Li, Soonjeon Youn, John Errett, Tsai-Yu Lin, et al. 2010. “2'-O Methylation of the Viral mRNA Cap Evades Host Restriction by IFIT Family Members.” *Nature* 468 (7322): 452–56. <https://doi.org/10.1038/nature09489>.

Das, Sulagna, Manoj Kumar Mishra, Joydeep Ghosh, and Anirban Basu. 2008. “Japanese Encephalitis Virus Infection Induces IL-18 and IL-1beta in Microglia and Astrocytes: Correlation with in Vitro Cytokine Responsiveness of Glial Cells and Subsequent Neuronal Death.” *Journal of Neuroimmunology* 195 (1–2): 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.01.009>.

Davis, B. S., G. J. Chang, B. Cropp, J. T. Roehrig, D. A. Martin, C. J. Mitchell, R. Bowen, and M. L. Bunning. 2001. “West Nile Virus Recombinant DNA Vaccine Protects Mouse and Horse from Virus Challenge and Expresses in Vitro a Noninfectious Recombinant Antigen That Can Be Used in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.” *Journal of Virology* 75 (9): 4040–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4040-4047.2001>.

Davis, Beckley K., Haitao Wen, and Jenny P.-Y. Ting. 2011. “The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases.” *Annual Review of Immunology* 29: 707–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>.

Davis, C. Todd, David W. C. Beasley, Hilda Guzman, Marina Siirin, Ray E. Parsons, Robert B. Tesh, and Alan D. T. Barrett. 2004. “Emergence of Attenuated West Nile Virus Variants in Texas, 2003.” *Virology* 330 (1): 342–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.016>.

Davis, C. Todd, Gregory D. Ebel, Robert S. Lanciotti, Aaron C. Brault, Hilda Guzman, Marina Siirin, Amy Lambert, et al. 2005. “Phylogenetic Analysis of North American West Nile Virus Isolates, 2001-2004: Evidence for the Emergence of a Dominant Genotype.” *Virology* 342 (2): 252–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.022>.

- Davis, C. Todd, Sareen E. Galbraith, Shuliu Zhang, Melissa C. Whiteman, Li Li, Richard M. Kinney, and Alan D. T. Barrett. 2007. "A Combination of Naturally Occurring Mutations in North American West Nile Virus Nonstructural Protein Genes and in the 3' Untranslated Region Alters Virus Phenotype." *Journal of Virology* 81 (11): 6111–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02387-06>.
- Davis, Carl W., Hai-Yen Nguyen, Sheri L. Hanna, Melissa D. Sánchez, Robert W. Doms, and Theodore C. Pierson. 2006. "West Nile Virus Discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for Cellular Attachment and Infection." *Journal of Virology* 80 (3): 1290–1301. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1290-1301.2006>.
- Desai, Pritesh, Hana Janova, James P. White, Glennys V. Reynoso, Heather D. Hickman, Megan T. Baldrige, Joseph F. Urban, Thaddeus S. Stappenbeck, Larissa B. Thackray, and Michael S. Diamond. 2021. "Enteric Helminth Coinfection Enhances Host Susceptibility to Neurotropic Flaviviruses via a Tuft Cell-IL-4 Receptor Signaling Axis." *Cell* 184 (5): 1214-1231.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.051>.
- Diamond, Michael S., and Robyn S. Klein. 2004. "West Nile Virus: Crossing the Blood-Brain Barrier." *Nature Medicine* 10 (12): 1294–95. <https://doi.org/10.1038/nm1204-1294>.
- Diamond, Michael S., Bimmi Shrestha, Anantha Marri, Darby Mahan, and Michael Engle. 2003. "B Cells and Antibody Play Critical Roles in the Immediate Defense of Disseminated Infection by West Nile Encephalitis Virus." *Journal of Virology* 77 (4): 2578–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.4.2578-2586.2003>.
- Ding, Shou-Wei. 2010. "RNA-Based Antiviral Immunity." *Nature Reviews. Immunology* 10 (9): 632–44. <https://doi.org/10.1038/nri2824>.
- Dodson, Brittany L., Grant L. Hughes, Oluwatobi Paul, Amy C. Matarachiero, Laura D. Kramer, and Jason L. Rasgon. 2014. "Wolbachia Enhances West Nile Virus (WNV) Infection in the Mosquito *Culex Tarsalis*." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (7): e2965. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002965>.
- Dridi, Pérez-Ramírez E, Llorente F, Jiménez-Clavero MÁ. 2014. "Experimental infections of wild birds with West Nile virus". *Viruses* 6(2):752-81. doi: 10.3390/v6020752
- Dridi, M., F. Rauw, B. Muylkens, S. Lecollinet, T. van den Berg, and B. Lambrecht. 2013. "Setting up a SPF Chicken Model for the Pathotyping of West Nile Virus (WNV) Strains." *Transboundary and Emerging Diseases* 60 Suppl 2 (November): 51–62. <https://doi.org/10.1111/tbed.12144>.
- Dridi, M., T. Rosseel, R. Orton, P. Johnson, S. Lecollinet, B. Muylkens, B. Lambrecht, and S. Van Borm. 2015. "Next-Generation Sequencing Shows West Nile Virus Quasispecies Diversification after a Single Passage in a Carrion Crow (*Corvus Corone*) in Vivo Infection Model." *The Journal of General Virology* 96 (10): 2999–3009. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000231>.
- Duggal, Nisha K., Kate E. Langwig, Gregory D. Ebel, and Aaron C. Brault. 2019. "On the Fly: Interactions Between Birds, Mosquitoes, and Environment That Have Molded West Nile Virus Genomic Structure Over Two Decades." *Journal of Medical Entomology* 56 (6): 1467–74. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz112>.
- Dupuis, Alan P., Peter P. Marra, and Laura D. Kramer. 2003. "Serologic Evidence of West Nile Virus Transmission, Jamaica, West Indies." *Emerging Infectious Diseases* 9 (7): 860–63. <https://doi.org/10.3201/eid0907.030249>.
- Durand, Benoit, Véronique Chevalier, Régis Pouillot, Jacques Labie, Ingrid Marendat, Bernadette Murgue, Hervé Zeller, and Stéphan Zientara. 2002. "West Nile Virus Outbreak in Horses, Southern France, 2000: Results of a Serosurvey." *Emerging Infectious Diseases* 8 (8): 777–82. <https://doi.org/10.3201/eid0808.010486>.
- Ebel, Gregory D., Justin Carricaburu, David Young, Kristen A. Bernard, and Laura D. Kramer. 2004. "Genetic and Phenotypic Variation of West Nile Virus in New York, 2000–2003." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (4): 493–500.
- El Harrack, M., B. Le Guenno, and P. Gounon. 1997. "Isolation of West Nile virus in Morocco." *Virologie (France)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Isolation+of+West+Nile+virus+in+Morocco&author=El+Harrack%2C+M.+%28Biopharma%2C+Rabat+%28Maroc%29%29&publication_year=1997.

- El-Sayed, Amr, and Mohamed Kamel. 2020. "Climatic Changes and Their Role in Emergence and Re-Emergence of Diseases." *Environmental Science and Pollution Research International* 27 (18): 22336–52. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08896-w>.
- Engler, Olivier, Giovanni Savini, Anna Papa, Jordi Figuerola, Martin H. Groschup, Helge Kampen, Jolyon Medlock, et al. 2013. "European Surveillance for West Nile Virus in Mosquito Populations." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (10): 4869–95. <https://doi.org/10.3390/ijerph10104869>.
- Erdélyi, Károly, Krisztina Ursu, Emöke Ferenczi, Levente Szeredi, Ferenc Rátz, József Skáre, and Tamás Bakonyi. 2007. "Clinical and Pathologic Features of Lineage 2 West Nile Virus Infections in Birds of Prey in Hungary." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (2): 181–88. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0586>.
- Evans, Jared D., Rachel A. Crown, Ji A. Sohn, and Christoph Seeger. 2011. "West Nile Virus Infection Induces Depletion of IFNAR1 Protein Levels." *Viral Immunology* 24 (4): 253–63. <https://doi.org/10.1089/vim.2010.0126>.
- Evans, Jared D., and Christoph Seeger. 2007. "Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling." *Journal of Virology* 81 (21): 11809–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.00791-07>.
- Fall, Gamou, Mawlouth Diallo, Cheikh Loucoubar, Ousmane Faye, and Amadou Alpha Sall. 2014. "Vector Competence of Culex Neavei and Culex Quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile Virus." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90 (4): 747–54. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0405>.
- Fang, Ying, and William K. Reisen. 2006. "Previous Infection with West Nile or St. Louis Encephalitis Viruses Provides Cross Protection during Reinfection in House Finches." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75 (3): 480–85.
- Farajollahi, Ary, Dina M. Fonseca, Laura D. Kramer, and A. Marm Kilpatrick. 2011. "'Bird Biting' Mosquitoes and Human Disease: A Review of the Role of Culex Pipiens Complex Mosquitoes in Epidemiology." *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 11 (7): 1577–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>.
- Feng, Xinyu, Shuisen Zhou, Jingwen Wang, and Wei Hu. 2018. "MicroRNA Profiles and Functions in Mosquitoes." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (5): e0006463. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006463>.
- Fiacre, Lise, Nonito Pagès, Emmanuel Albina, Jennifer Richardson, Sylvie Lecollinet, and Gaëlle Gonzalez. 2020. "Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239117>.
- Fischer, Staci A. 2008. "Emerging Viruses in Transplantation: There Is More to Infection after Transplant than CMV and EBV." *Transplantation* 86 (10): 1327–39. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31818b6548>.
- Fredericksen, Brenda L., and Michael Gale. 2006. "West Nile Virus Evades Activation of Interferon Regulatory Factor 3 through RIG-I-Dependent and -Independent Pathways without Antagonizing Host Defense Signaling." *Journal of Virology* 80 (6): 2913–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.2913-2923.2006>.
- Fredericksen, Brenda L., Brian C. Keller, Jamie Fornek, Michael G. Katze, and Michael Gale. 2008. "Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves Both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1." *Journal of Virology* 82 (2): 609–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01305-07>.
- Fuente, José de la, Sandra Antunes, Sarah Bonnet, Alejandro Cabezas-Cruz, Ana G. Domingos, Agustín Estrada-Peña, Nicholas Johnson, et al. 2017. "Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>.

- Gamino, Virginia, and Ursula Höfle. 2013. "Pathology and Tissue Tropism of Natural West Nile Virus Infection in Birds: A Review." *Veterinary Research* 44 (1): 39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-39>.
- Gancz, Ady Y., Douglas G. Campbell, Ian K. Barker, Robbin Lindsay, and Bruce Hunter. 2004. "Detecting West Nile Virus in Owls and Raptors by an Antigen-Capture Assay." *Emerging Infectious Diseases* 10 (12): 2204–6. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040168>.
- Gillespie, Leah K., Antje Hoenen, Gary Morgan, and Jason M. Mackenzie. 2010. "The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex." *Journal of Virology* 84 (20): 10438–47. <https://doi.org/10.1128/JVI.00986-10>.
- Girard, Yvette A., Kimberly A. Klingler, and Stephen Higgs. 2004. "West Nile Virus Dissemination and Tissue Tropisms in Orally Infected *Culex pipiens quinquefasciatus*." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 4 (2): 109–22. <https://doi.org/10.1089/1530366041210729>.
- Glaser, Robert L., and Mark A. Meola. 2010. "The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection." *PLoS One* 5 (8): e11977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>.
- Goldberg, Tony L., Tavis K. Anderson, and Gabriel L. Hamer. 2010. "West Nile Virus May Have Hitched a Ride across the Western United States on *Culex tarsalis* Mosquitoes." *Molecular Ecology* 19 (8): 1518–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04578.x>.
- Gossner, Céline M., Laurence Marrama, Marianne Carson, Franz Allerberger, Paolo Calistri, Dimitrios Dilaveris, Sylvie Lecollinet, et al. 2017. "West Nile Virus Surveillance in Europe: Moving towards an Integrated Animal-Human-Vector Approach." *Euro Surveill: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 22 (18): 30526. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.18.30526>.
- Greenwood, John, Claire L. Amos, Claire E. Walters, Pierre-Olivier Couraud, Ruth Lyck, Britta Engelhardt, and Peter Adamson. 2003. "Intracellular Domain of Brain Endothelial ICAM-1 Is Essential for T-Lymphocyte-Mediated Signalling and Migration." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171 (4): 2099–2108.
- Hadfield, James, Anderson F. Brito, Daniele M. Swetnam, Chantal B. F. Vogels, Ryan E. Tokarz, Kristian G. Andersen, Ryan C. Smith, Trevor Bedford, and Nathan D. Grubaugh. 2019. "Twenty Years of West Nile Virus Spread and Evolution in the Americas Visualized by Nextstrain." *PLoS Pathogens* 15 (10): e1008042. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008042>.
- Hahn, C. S., Y. S. Hahn, C. M. Rice, E. Lee, L. Dalgarno, E. G. Strauss, and J. H. Strauss. 1987. "Conserved Elements in the 3' Untranslated Region of Flavivirus RNAs and Potential Cyclization Sequences." *Journal of Molecular Biology* 198 (1): 33–41. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90455-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90455-4).
- Hanna, Sheri L., Theodore C. Pierson, and Melissa D. Sanchez. 2005. "N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity."
- Hannoun, C., R. Panthier, J. Mouchet, and J. P. Eouzan. 1964. "[ISOLATION IN FRANCE OF THE WEST NILE VIRUS FROM PATIENTS AND FROM THE VECTOR *CULEX MODESTUS FICALBI*]." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences* 259 (November): 4170–72.
- Heinz, F. X., K. Stiasny, G. Püschner-Auer, H. Holzmann, S. L. Allison, C. W. Mandl, and C. Kunz. 1994. "Structural Changes and Functional Control of the Tick-Borne Encephalitis Virus Glycoprotein E by the Heterodimeric Association with Protein PrM." *Virology* 198 (1): 109–17. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1013>.
- Hemmer, Christoph Josef, Petra Emmerich, Micha Loebermann, Silvius Frimmel, and Emil Christian Reisinger. 2018. "[Mosquitoes and Ticks: The Influence of Global Warming in the Transmission of Infectious Diseases in Germany]." *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)* 143 (23): 1714–22. <https://doi.org/10.1055/a-0653-6333>.
- Hernández-Triana, Luis M., Claire L. Jeffries, Karen L. Mansfield, George Carnell, Anthony R. Fooks, and

- Nicholas Johnson. 2014. "Emergence of West Nile Virus Lineage 2 in Europe: A Review on the Introduction and Spread of a Mosquito-Borne Disease." *Frontiers in Public Health* 2: 271. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00271>.
- Hess, Ann M., Abhishek N. Prasad, Andrey Ptitsyn, Gregory D. Ebel, Ken E. Olson, Catalin Barbacioru, Cinna Monighetti, and Corey L. Campbell. 2011. "Small RNA Profiling of Dengue Virus-Mosquito Interactions Implicates the PIWI RNA Pathway in Anti-Viral Defense." *BMC Microbiology* 11 (February): 45. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-45>.
- Hinckley, Alison F., Daniel R. O'Leary, and Edward B. Hayes. 2007. "Transmission of West Nile Virus through Human Breast Milk Seems to Be Rare." *Pediatrics* 119 (3): e666-671. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2107>.
- Hoffmann, L., J. Mouchet, J. Rageau, C. Hannoun, L. Joubert, J. Oudar, and D. Beytout. 1968. "Epidémiologie du virus West Nile: étude d'un foyer en Camargue. II. Esquisse du milieu physique, biologique et humain." *Annales de l'Institut Pasteur* 114 (4): 521-38.
- Hong, Shanchao, Qin Guo, Weijie Wang, Shengli Hu, Fujin Fang, Yuan Lv, Jing Yu, et al. 2014. "Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Culex Pipiens and Their Potential Roles in Pyrethroid Resistance." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 55 (December): 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.10.007>.
- Hribar L, Stark LM, Stoner RL. et al. 2004. Isolation of West Nile Virus from mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Florida Keys, Monroe County, Florida
- Hubálek, Z., and J. Halouzka. 1999. "West Nile Fever--a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe." *Emerging Infectious Diseases* 5 (5): 643-50. <https://doi.org/10.3201/eid0505.990505>.
- Hurlbut, H. S., F. Rizk, R. M. Taylor, and T. H. Work. 1956. "A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5 (4): 579-620. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1956.5.579>.
- Hussain, Syed Shah Areeb, and Ramesh C. Dhiman. 2022. "Distribution Expansion of Dengue Vectors and Climate Change in India." *GeoHealth* 6 (6): e2021GH000477. <https://doi.org/10.1029/2021GH000477>.
- Jesus, Adriana A., and Raphaela Goldbach-Mansky. 2014. "IL-1 Blockade in Autoinflammatory Syndromes." *Annual Review of Medicine* 65: 223-44. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-061512-150641>.
- Jiménez de Oya, Nereida, María-Cruz Camacho, Ana-Belén Blázquez, José-Francisco Lima-Barbero, Juan-Carlos Saiz, Ursula Höfle, and Estela Escribano-Romero. 2018. "High Susceptibility of Magpie (Pica Pica) to Experimental Infection with Lineage 1 and 2 West Nile Virus." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (4): e0006394. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006394>.
- Joubert, L., J. Oudar, C. Hannoun, D. Beytout, B. Corniou, J. C. Guillon, and R. Panthier. 1970. "[Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]." *Annales De l'Institut Pasteur* 118 (2): 239-47.
- Jourdain, E., Y. Toussaint, A. Leblond, D. J. Bicout, P. Sabatier, and M. Gauthier-Clerc. 2007. "Bird Species Potentially Involved in Introduction, Amplification, and Spread of West Nile Virus in a Mediterranean Wetland, the Camargue (Southern France)." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (1): 15-33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0543>.
- Jupp, P. G. 2001. "The Ecology of West Nile Virus in South Africa and the Occurrence of Outbreaks in Humans." *Annals of the New York Academy of Sciences* 951 (December): 143-52. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02692.x>.
- Kampen, Helge, Cora M. Holicki, Ute Ziegler, Martin H. Groschup, Birke Andrea Tews, and Doreen Werner. 2020. "West Nile Virus Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) in Germany." *Viruses* 12 (5): 493. <https://doi.org/10.3390/v12050493>.
- Kaufmann, Bärbel, and Michael G. Rossmann. 2011. "Molecular Mechanisms Involved in the Early Steps of

- Flavivirus Cell Entry.” *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 13 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.005>.
- Kebaier, Chahnaz, and Jerome P. Vanderberg. 2006. “Re-Ingestion of Plasmodium Berghei Sporozoites after Delivery into the Host by Mosquitoes.” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75 (6): 1200–1204.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics.” *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- Khan, S. A., S. Kakati, P. Chowdhury, and P. Dutta. 2016. “West Nile Virus Circulation and Incrimination of Mosquito Vectors in Northeast India.” *International Journal of Infectious Diseases* 45 (April): 179. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.420>.
- Kim, Young Keun, Jeon-Soo Shin, and Moon H. Nahm. 2016. “NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases.” *Yonsei Medical Journal* 57 (1): 5–14. <https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>.
- Klein, RS, and MS Diamond. 2008. “Immunological Headgear: Antiviral Immune Responses Protect against Neuroinvasive West Nile Virus.” 14(7):286-94. doi: 10.1016/j.molmed.2008.05.004.
- Klema, Valerie J., Mengyi Ye, Aditya Hindupur, Tadahisa Teramoto, Keerthi Gottipati, Radhakrishnan Padmanabhan, and Kyung H. Choi. 2016. “Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface.” *PLoS Pathogens* 12 (2): e1005451. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005451>.
- Knipe, D.M.; Howley, P. *Fields Virology*, 6th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013
- Komar, Nicholas. 2003. “West Nile Virus: Epidemiology and Ecology in North America.” *Advances in Virus Research* 61: 185–234. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61005-5](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61005-5).
- Komar, Oliver, Mark B. Robbins, Kaci Klenk, Bradley J. Blitvich, Nicole L. Marlenee, Kristen L. Burkhalter, Duane J. Gubler, et al. 2003. “West Nile Virus Transmission in Resident Birds, Dominican Republic.” *Emerging Infectious Diseases* 9 (10): 1299–1302. <https://doi.org/10.3201/eid0910.030222>.
- Kong, Kok-Fai, Karine Delroux, Xiaomei Wang, Feng Qian, Alvaro Arjona, Stephen E. Malawista, Erol Fikrig, and Ruth R. Montgomery. 2008. “Dysregulation of TLR3 Impairs the Innate Immune Response to West Nile Virus in the Elderly.” *Journal of Virology* 82 (15): 7613–23. <https://doi.org/10.1128/JVI.00618-08>.
- Krishnan, Manoj N., Bindu Sukumaran, Utpal Pal, Herve Agaisse, James L. Murray, Thomas W. Hodge, and Erol Fikrig. 2007. “Rab 5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses.” *Journal of Virology* 81 (9): 4881–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.02210-06>.
- Lanciotti, RS, JT Roehrig, V Deubel, and J Smith. 1999. “Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States”. *Science* 286(5448):2333-7. doi: 10.1126/science.286.5448.2333.
- Langevin, Stanley A., Richard A Bowen, and William K Reisen. 2014. “Host Competence and Helicase Activity Differences Exhibited by West Nile Viral Variants Expressing NS3-249 Amino Acid Polymorphisms.” 9(6):e100802. doi: 10.1371/journal.pone.0100802
- Lanteri, Marion C., Azzedine Assal, Philip J. Norris, and Michael P. Busch. 2011. “[West Nile virus - I. conquest of the West].” *Medecine Sciences: M/S* 27 (4): 375–81. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274012>.
- Laschinger, M., and B. Engelhardt. 2000. “Interaction of Alpha4-Integrin with VCAM-1 Is Involved in Adhesion of Encephalitogenic T Cell Blasts to Brain Endothelium but Not in Their Transendothelial Migration in Vitro.” *Journal of Neuroimmunology* 102 (1): 32–43. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00156-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00156-3).
- Laurent-Rolle, Maudry, Elena F. Boer, Kirk J. Lubick, James B. Wolfenbarger, Aaron B. Carmody, Barry Rockx, Wenjun Liu, et al. 2010. “The NS5 Protein of the Virulent West Nile Virus NY99 Strain Is a Potent

- Antagonist of Type I Interferon-Mediated JAK-STAT Signaling.” *Journal of Virology* 84 (7): 3503–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01161-09>.
- Lecollinet S , Thierry Lefrançois (2) , Benoit Durand (3) , Agnès Leblond (4, 5, 6) , Gwenaëlle Dauphin (7) , Jocelyn de Goer de Herve (4) , Stéphan Zientara (1). Surveillance de l'infection équine à virus West Nile en France : bilan 2000-2007. 2008.
- Leung, Jason Y., Gorben P. Pijlman, Natasha Kondratieva, Jennifer Hyde, Jason M. Mackenzie, and Alexander A. Khromykh. 2008. “Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly.” *Journal of Virology* 82 (10): 4731–41. <https://doi.org/10.1128/JVI.00002-08>.
- Leur, Sophie Wilhelmina van, Tiaan Heunis, Deeksha Munnur, and Sumana Sanyal. 2021. “Pathogenesis and Virulence of Flavivirus Infections.” *Virulence* 12 (1): 2814–38. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>.
- Lieberman, Michael M., David E. Clements, Steven Ogata, Gordon Wang, Gloria Corpuz, Teri Wong, Tim Martyak, et al. 2007. “Preparation and Immunogenic Properties of a Recombinant West Nile Subunit Vaccine.” *Vaccine* 25 (3): 414–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.08.018>.
- Lieberman, Michael M., Vivek R. Nerurkar, Haiyan Luo, Bruce Cropp, Ricardo Carrion, Melissa de la Garza, Beth-Ann Coller, et al. 2009. “Immunogenicity and Protective Efficacy of a Recombinant Subunit West Nile Virus Vaccine in Rhesus Monkeys.” *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 16 (9): 1332–37. <https://doi.org/10.1128/CVI.00119-09>.
- Liu, Wen Jun, Hua Bo Chen, Xiang Ju Wang, Hester Huang, and Alexander A. Khromykh. 2004. “Analysis of Adaptive Mutations in Kunjin Virus Replicon RNA Reveals a Novel Role for the Flavivirus Nonstructural Protein NS2A in Inhibition of Beta Interferon Promoter-Driven Transcription.” *Journal of Virology* 78 (22): 12225–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12225-12235.2004>.
- Liu, Wen Jun, Xiang Ju Wang, David C. Clark, Mario Lobigs, Roy A. Hall, and Alexander A. Khromykh. 2006. “A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha/Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice.” *Journal of Virology* 80 (5): 2396–2404. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2396-2404.2006>.
- Lourenço, José, Francesco Pinotti, Taishi Nakase, Marta Giovanetti, and Uri Obolski. 2022. “Letter to the Editor: Atypical Weather Is Associated with the 2022 Early Start of West Nile Virus Transmission in Italy.” *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 27 (34): 2200662. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.34.2200662>.
- Lvov, D. K., A. M. Butenko, V. L. Gromashevsky, A. I. Kovtunov, A. G. Prilipov, R. Kinney, V. A. Aristova, et al. 2004. “West Nile Virus and Other Zoonotic Viruses in Russia: Examples of Emerging-Reemerging Situations.” *Archives of Virology. Supplementum*, no. 18: 85–96. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6_7.
- Mackenzie, J. M., A. A. Khromykh, M. K. Jones, and E. G. Westaway. 1998. “Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A.” *Virology* 245 (2): 203–15. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9156>.
- Malkinson, Mertyn, Caroline Banet, Yoram Weisman, Shimon Pokamunski, Roni King, Marie-Thérèse Drouet, and Vincent Deubel. 2002. “Introduction of West Nile Virus in the Middle East by Migrating White Storks.” *Emerging Infectious Diseases* 8 (4): 392–97. <https://doi.org/10.3201/eid0804.010217>.
- Mashimo T, Lucas M, Simon-Chazottes D, Frenkiel MP, Montagutelli X, Ceccaldi PE, Deubel V, Guenet JL, Despres. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11311-6. doi: 10.1073/pnas.172195399.
- Marianneau, P., A. Cardona, L. Edelman, V. Deubel, and P. Desprès. 1997. “Dengue Virus Replication in Human Hepatoma Cells Activates NF-KappaB Which in Turn Induces Apoptotic Cell Death.” *Journal of Virology* 71 (4): 3244–49. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.4.3244-3249.1997>.

- Marr, John S., and Charles H. Calisher. 2003. "Alexander the Great and West Nile Virus Encephalitis." *Emerging Infectious Diseases* 9 (12): 1599–1603. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030288>.
- Martin, Julie E., Theodore C. Pierson, Sarah Hubka, Steve Rucker, Ingelise J. Gordon, Mary E. Enama, Charla A. Andrews, et al. 2007. "A West Nile Virus DNA Vaccine Induces Neutralizing Antibody in Healthy Adults during a Phase 1 Clinical Trial." *The Journal of Infectious Diseases* 196 (12): 1732–40. <https://doi.org/10.1086/523650>.
- Martin, Marie-France, and Yannick Simonin. 2019. "[West Nile virus historical progression in Europe]." *Virologie (Montrouge, France)* 23 (5): 265–70. <https://doi.org/10.1684/vir.2019.0787>.
- Mavrouli, Maria, Georgia Vrioni, Violetta Kapsimali, Constantinos Tsiamis, Spyridon Mavroulis, Danaï Pervanidou, Charalambos Billinis, Christos Hadjichristodoulou, and Athanassios Tsakris. 2019. "Reemergence of West Nile Virus Infections in Southern Greece, 2017." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 100 (2): 420–26. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0339>.
- May, Fiona J., C. Todd Davis, Robert B. Tesh, and Alan D. T. Barrett. 2011. "Phylogeography of West Nile Virus: From the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas." *Journal of Virology* 85 (6): 2964–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01963-10>.
- McGregor, Bethany L., Joan L. Kenney, and C. Roxanne Connelly. 2021. "The Effect of Fluctuating Incubation Temperatures on West Nile Virus Infection in Culex Mosquitoes." *Viruses* 13 (9): 1822. <https://doi.org/10.3390/v13091822>.
- McIntosh, B. M., P. G. Jupp, D. B. Dickinson, G. M. McGillivray, and J. Sweetnam. 1967. "Ecological Studies on Sindbis and West Nile Viruses in South Africa. I. Viral Activity as Revealed by Infection of Mosquitoes and Sentinel Fowls." *The South African Journal of Medical Sciences* 32 (1): 1–14.
- Medigeshi, Guruprasad R., Alec J. Hirsch, James D. Brien, Jennifer L. Uhrlaub, Peter W. Mason, Clayton Wiley, Janko Nikolich-Zugich, and Jay A. Nelson. 2009. "West Nile Virus Capsid Degradation of Claudin Proteins Disrupts Epithelial Barrier Function." *Journal of Virology* 83 (12): 6125–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.02617-08>.
- Melnick, J. L., J. R. Paul, J. T. Riordan, V. H. Barnett, N. Goldblum, and E. Zabin. 1951. "Isolation from Human Sera in Egypt of a Virus Apparently Identical to West Nile Virus." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 77 (4): 661–65. <https://doi.org/10.3181/00379727-77-18884>.
- Mencattelli, Giulia, Marie Henriette Dior Ndione, Roberto Rosà, Giovanni Marini, Cheikh Tidiane Diagne, Moussa Moïse Diagne, Gamou Fall, et al. 2022. "Epidemiology of West Nile Virus in Africa: An Underestimated Threat." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16 (1): e0010075. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010075>.
- Meusemann K, von Reumont BM, Simon S, Roeding F, Strauss S, Kück P, Ebersberger I, Walz M, Pass G, Breuers S, Achter V, von Haeseler A, Burmester T, Hadrys H, Wägele W, Misof B. 2010. "A phylogenomic approach to resolve the arthropod tree of life" *Mol Biol Evol* 27(11):2451-64. doi: 10.1093/molbev/msq130.
- M'ghirbi Y, Mousson L, Moutailler S, Lecollinet S, Amaral R, Beck C, Aounallah H, Amara M, Chabchoub A, Rhim A, Failloux AB, Bouattour A. 2023. "West Nile, Sindbis and Usutu Viruses: Evidence of Circulation in Mosquitoes and Horses in Tunisia". *Pathogens* 12(3):360. doi: 10.3390/pathogens12030360.
- Minke, J. M., L. Siger, K. Karaca, L. Austgen, P. Gordy, R. Bowen, R. W. Renshaw, S. Loosmore, J. C. Audonnet, and B. Nordgren. 2004. "Recombinant Canarypoxvirus Vaccine Carrying the PrM/E Genes of West Nile Virus Protects Horses against a West Nile Virus-Mosquito Challenge." *Archives of Virology. Supplementum*, no. 18: 221–30. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6_20.
- Monaco F, Lelli R, Teodori L, Pinoni C, Di Gennaro A, Polci A, Calistri P, Savini G. 2010. "Re-emergence of West Nile virus in Italy". *Zoonoses Public Health* 57(7-8):476-86. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01245.x.
- Monath, T. P. 2001. "Prospects for Development of a Vaccine against the West Nile Virus." *Annals of the New*

York Academy of Sciences 951 (December): 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02680.x>.

Monini, Marina, Emiliana Falcone, Luca Busani, Roberto Romi, and Franco Maria Ruggeri. 2010. “West Nile Virus: Characteristics of an African Virus Adapting to the Third Millennium World.” *The Open Virology Journal* 4 (April): 42–51. <https://doi.org/10.2174/1874357901004020042>.

Montgomery, Ruth R., and Kristy O. Murray. 2015. “Risk Factors for West Nile Virus Infection and Disease in Populations and Individuals.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 13 (3): 317–25. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1007043>.

Montgomery, Ruth R., and Albert C. Shaw. 2015. “Paradoxical Changes in Innate Immunity in Aging: Recent Progress and New Directions.” *Journal of Leukocyte Biology* 98 (6): 937–43. <https://doi.org/10.1189/jlb.5MR0315-104R>.

Morazzani, Elaine M., Michael R. Wiley, Marta G. Murreddu, Zach N. Adelman, and Kevin M. Myles. 2012. “Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent PiRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma.” *PLoS Pathogens* 8 (1): e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>.

Mores, Christopher N., Michael J. Turell, David J. Dohm, Jamie A. Blow, Marco T. Carranza, and Miguel Quintana. 2007. “Experimental Transmission of West Nile Virus by *Culex Nigripalpus* from Honduras.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (2): 279–84. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0557>.

Morozova, O. V., N. A. Tsekhanovskaya, T. G. Maksimova, V. N. Bachvalova, V. A. Matveeva, and null Kit YYa. 1997. “Phosphorylation of Tick-Borne Encephalitis Virus NS5 Protein.” *Virus Research* 49 (1): 9–15. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(96\)01433-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(96)01433-5).

Moudy, Robin M., Mark A. Meola, and Laura-Lee Morin. 2007. “A Newly Emergent Genotype of West Nile Virus Is Transmitted Earlier and More Efficiently by *Culex* Mosquitoes.” *Am J Trop Med Hyg* 77(2):365-70.

Moudy, Robin M., Bo Zhang, and Pei-Yong Shi. 2009. “West Nile Virus Envelope Protein Glycosylation Is Required for Efficient Viral Transmission by *Culex* Vectors.” *Virology* 387(1):222-8. doi: 10.1016/j.virol.2009.01.038.

Mukhopadhyay, Suchetana, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. 2005. “A Structural Perspective of the Flavivirus Life Cycle.” *Nature Reviews. Microbiology* 3 (1): 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>.

Muñoz-Jordan, Jorge L., Gilma G. Sánchez-Burgos, Maudry Laurent-Rolle, and Adolfo García-Sastre. 2003. “Inhibition of Interferon Signaling by Dengue Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (24): 14333–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>.

Murgue, B., S. Murri, H. Triki, V. Deubel, and H. G. Zeller. 2001. “West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 951 (December): 117–26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02690.x>.

Murgue, B, S Murri, S Zientara, B Durand, J P Durand, and H Zeller. 2001. “West Nile Outbreak in Horses in Southern France, 2000: The Return after 35 Years.” *Emerging Infectious Diseases* 7 (4): 692–96.

Nemeth, Nicole M., Angela M. Bosco-Lauth, and Richard A. Bowen. 2009. “Cross-Protection between West Nile and Japanese Encephalitis Viruses in Red-Winged Blackbirds (*Agelaius Phoeniceus*).” *Avian Diseases* 53 (3): 421–25. <https://doi.org/10.1637/8574-010109-Reg.1>.

Nemeth, Nicole M., Paul T. Oesterle, and Richard A. Bowen. 2009. “Humoral Immunity to West Nile Virus Is Long-Lasting and Protective in the House Sparrow (*Passer Domesticus*).” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (5): 864–69.

Nemeth, Nicole, Ginger Young, Christina Ndaluka, Helle Bielefeldt-Ohmann, Nicholas Komar, and Richard Bowen. 2009. “Persistent West Nile Virus Infection in the House Sparrow (*Passer Domesticus*).” *Archives of Virology* 154 (5): 783–89. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0369-x>.

Nett, R. J., M. J. Kuehnert, M. G. Ison, J. P. Orlowski, M. Fischer, and J. E. Staples. 2012. “Current Practices and Evaluation of Screening Solid Organ Donors for West Nile Virus.” *Transplant Infectious Disease: An*

- Official Journal of the Transplantation Society* 14 (3): 268–77. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2012.00743.x>.
- Ng, T., D. Hathaway, N. Jennings, D. Champ, Y. W. Chiang, and H. J. Chu. 2003. “Equine Vaccine for West Nile Virus.” *Developments in Biologicals* 114: 221–27.
- Nishida, Kazumichi M., Kuniaki Saito, Tomoko Mori, Yoshinori Kawamura, Tomoko Nagami-Okada, Sachi Inagaki, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi. 2007. “Gene Silencing Mechanisms Mediated by Aubergine PiRNA Complexes in *Drosophila* Male Gonad.” *RNA (New York, N.Y.)* 13 (11): 1911–22. <https://doi.org/10.1261/rna.744307>.
- Oliveira, Ana, Charles R. Katholi, Nathan Burkett-Cadena, Hassan K. Hassan, Sibylle Kristensen, and Thomas R. Unnasch. 2011. “Temporal Analysis of Feeding Patterns of *Culex erraticus* in Central Alabama.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (4): 413–21. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0258>.
- Ontario Agency for Health Protection and Promotion (Public Health Ontario). Vector-borne diseases:2016 summary report. Toronto, ON: Queen's Printer for Ontario; 2017.
- Ozkurede, V. U., and L. Franchi. 2012. “Immunology in Clinic Review Series; Focus on Autoinflammatory Diseases: Role of Inflammasomes in Autoinflammatory Syndromes.” *Clinical and Experimental Immunology* 167 (3): 382–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04535.x>.
- Pachler, Karin, Karin Lebl, Dominik Berer, Ivo Rudolf, Zdenek Hubalek, and Norbert Nowotny. 2014. “Putative New West Nile Virus Lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013.” *Emerging Infectious Diseases* 20 (12): 2119–22. <https://doi.org/10.3201/eid2012.140921>.
- Papa, A., K. Danis, A. Baka, A. Bakas, G. Dougas, T. Lytras, G. Theocharopoulos, et al. 2010. “Ongoing Outbreak of West Nile Virus Infections in Humans in Greece, July-August 2010.” *Euro Surveill: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 15 (34). <https://doi.org/10.2807/ese.15.34.19644-en>.
- Papa, A., K. Xanthopoulou, S. Gewehr, and S. Mourelatos. 2011. “Detection of West Nile Virus Lineage 2 in Mosquitoes during a Human Outbreak in Greece.” *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17 (8): 1176–80. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03438.x>.
- Paradkar, Prasad N., Lee Trinidad, Rhonda Voysey, Jean-Bernard Duchemin, and Peter J. Walker. 2012. “Secreted Vago Restricts West Nile Virus Infection in *Culex* Mosquito Cells by Activating the Jak-STAT Pathway.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (46): 18915–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205231109>.
- Parquet, M. C., A. Kumatori, F. Hasebe, K. Morita, and A. Igarashi. 2001. “West Nile Virus-Induced Bax-Dependent Apoptosis.” *FEBS Letters* 500 (1–2): 17–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02573-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02573-x).
- Pealer, Lisa N., Anthony A. Marfin, Lyle R. Petersen, Robert S. Lanciotti, Peter L. Page, Susan L. Stramer, Mary Grace Stobierski, et al. 2003. “Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002.” *The New England Journal of Medicine* 349 (13): 1236–45. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030969>.
- Peluso, Richard, Ashley Haase, Linda Stowring, Mike Edwards, and Peter Ventura. 1985. “A Trojan Horse Mechanism for the Spread of Visna Virus in Monocytes.” *Virology* 147 (1): 231–36. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90246-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90246-6).
- Pérez-Ramírez, Elisa, Francisco Llorente, and Javier del Amo. 2017. “Pathogenicity Evaluation of Twelve West Nile Virus Strains Belonging to Four Lineages from Five Continents in a Mouse Model: Discrimination between Three Pathogenicity Categories.” *J Gen Virol* 98(4):662-670. doi: 10.1099/jgv.0.000743.
- Pérez-Ramírez, Elisa, Francisco Llorente, and Miguel Ángel Jiménez-Clavero. 2014. “Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus.” *Viruses* 6 (2): 752–81. <https://doi.org/10.3390/v6020752>.

- Persidsky, Yuri, Servio H. Ramirez, James Haorah, and Georgette D. Kanmogne. 2006. "Blood-Brain Barrier: Structural Components and Function under Physiologic and Pathologic Conditions." *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 1 (3): 223–36. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9025-3>.
- Perwitasari, Olivia, Hyelim Cho, Michael S. Diamond, and Michael Gale. 2011. "Inhibitor of KB Kinase ϵ (IKK ϵ), STAT1, and IFIT2 Proteins Define Novel Innate Immune Effector Pathway against West Nile Virus Infection." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (52): 44412–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.285205>.
- Petersen, Lyle R., and Anthony A. Marfin. 2002. "West Nile Virus: A Primer for the Clinician." *Annals of Internal Medicine* 137 (3): 173–79. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-137-3-200208060-00009>.
- Pilo-Moron, E., J. Vincent, and Y. Le Corroller. 1970. "[Isolation of a West-Nile virus in the extreme south of the Algerian Sahara (Djanet)]." *Archives De l'Institut Pasteur d'Algerie. Institut Pasteur d'Algerie* 48: 181–84.
- Pletnev, Alexander G., Marisa St Claire, Randy Elkins, Jim Speicher, Brian R Murphy, and Robert M Chanock. 2003. "Molecularly Engineered Live-Attenuated Chimeric West Nile/Dengue Virus Vaccines Protect Rhesus Monkeys from West Nile Virus." *Virology* 314 (1): 190–95. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00450-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00450-1).
- Pletnev, Alexander G., David E. Swayne, Jim Speicher, Alexander A. Rumyantsev, and Brian R. Murphy. 2006. "Chimeric West Nile/Dengue Virus Vaccine Candidate: Preclinical Evaluation in Mice, Geese and Monkeys for Safety and Immunogenicity." *Vaccine* 24 (40–41): 6392–6404. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.008>.
- Prasad, Abhishek N., Doug E. Brackney, and Gregory D. Ebel. 2013. "The Role of Innate Immunity in Conditioning Mosquito Susceptibility to West Nile Virus." *Viruses* 5 (12): 3142–70. <https://doi.org/10.3390/v5123142>.
- Puig-Basagoiti, Francesc, Mark Tilgner, Corey J. Bennett, Yangsheng Zhou, Jorge L. Muñoz-Jordán, Adolfo García-Sastre, Kristen A. Bernard, and Pei-Yong Shi. 2007. "A Mouse Cell-Adapted NS4B Mutation Attenuates West Nile Virus RNA Synthesis." *Virology* 361 (1): 229–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.11.012>.
- Qian, Feng, Xiaomei Wang, Lin Zhang, Aiping Lin, Hongyu Zhao, Erol Fikrig, and Ruth R. Montgomery. 2011. "Impaired Interferon Signaling in Dendritic Cells from Older Donors Infected in Vitro with West Nile Virus." *The Journal of Infectious Diseases* 203 (10): 1415–24. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir048>.
- Quirin, René, Michel Salas, Stéphan Zientara, Hervé Zeller, Jacques Labie, Séverine Murri, Thierry Lefrançois, Martial Petitclerc, and Dominique Martinez. 2004. "West Nile Virus, Guadeloupe." *Emerging Infectious Diseases* 10 (4): 706–8. <https://doi.org/10.3201/eid1004.030465>.
- Ramos, Hilario J., Marion C. Lanteri, Gabriele Blahnik, Amina Negash, Mehul S. Suthar, Margaret M. Brassil, Khushbu Sodhi, et al. 2012. "IL-1 β Signaling Promotes CNS-Intrinsic Immune Control of West Nile Virus Infection." *PLoS Pathogens* 8 (11): e1003039. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003039>.
- Rand, Tim A., Krzysztof Ginalski, Nick V. Grishin, and Xiaodong Wang. 2004. "Biochemical Identification of Argonaute 2 as the Sole Protein Required for RNA-Induced Silencing Complex Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (40): 14385–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405913101>.
- Rastogi, Meghana, Nikhil Sharma, and Sunit Kumar Singh. 2016. "Flavivirus NS1: A Multifaceted Enigmatic Viral Protein." *Virology Journal* 13 (July): 131. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.
- Reed, K. E., A. E. Gorbalenya, and C. M. Rice. 1998. "The NS5A/NS5 Proteins of Viruses from Three Genera of the Family Flaviviridae Are Phosphorylated by Associated Serine/Threonine Kinases." *Journal of Virology* 72 (7): 6199–6206. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.7.6199-6206.1998>.
- Reisen, William K., Kerry Padgett, Ying Fang, Leslie Woods, Leslie Foss, Jaynia Anderson, and Vicki Kramer. 2013. "Chronic Infections of West Nile Virus Detected in California Dead Birds." *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 13 (6): 401–5. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1097>.

- Rodhain, F. 1991. "Le Fonctionnement Des Systèmes Virus-Vecteurs." *Annales de La Société Belge de Médecine Tropicale* 71 (Suppl.1): 189–99
- Rochlin, Ilia, Ary Faraji, Dominick V. Ninivaggi, Christopher M. Barker, and A. Marm Kilpatrick. 2016. "Anthropogenic Impacts on Mosquito Populations in North America over the Past Century." *Nature Communications* 7 (December): 13604. <https://doi.org/10.1038/ncomms13604>.
- Ronca, Shannon E., Kristy O. Murray, and Melissa S. Nolan. 2019. "Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999-2016." *Emerging Infectious Diseases* 25 (2): 325–27. <https://doi.org/10.3201/eid2502.180765>.
- Rossi, Shannan L., Ted M. Ross, and Jared D. Evans. 2010. "West Nile Virus." *Clinics in Laboratory Medicine* 30 (1): 47–65. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.006>.
- Rudolf, Ivo, Lenka Betášová, Hana Blažejová, Kristýna Venclíková, Petra Straková, Oldřich Šebesta, Jan Mendel, et al. 2017. "West Nile Virus in Overwintering Mosquitoes, Central Europe." *Parasites & Vectors* 10 (1): 452. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2399-7>.
- Saito, Takeshi, and Michael Gale. 2008. "Differential Recognition of Double-Stranded RNA by RIG-I-like Receptors in Antiviral Immunity." *The Journal of Experimental Medicine* 205 (7): 1523–27. <https://doi.org/10.1084/jem.20081210>.
- Saiz, Juan-Carlos, Miguel A. Martín-Acebes, Ana B. Blázquez, Estela Escribano-Romero, Teresa Poderoso, and Nereida Jiménez de Oya. n.d. "Pathogenicity and Virulence of West Nile Virus Revisited Eight Decades after Its First Isolation." *Virulence* 12 (1): 1145–73. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1908740>.
- Samina, Itzhak, Yevgeny Khinich, Michael Simanov, and Mertyn Malkinson. 2005. "An Inactivated West Nile Virus Vaccine for Domestic Geese-Efficacy Study and a Summary of 4 Years of Field Application." *Vaccine* 23 (41): 4955–58. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.03.052>.
- Samuel, Melanie A., and Michael S. Diamond. 2005. "Alpha/Beta Interferon Protects against Lethal West Nile Virus Infection by Restricting Cellular Tropism and Enhancing Neuronal Survival." *Journal of Virology* 79 (21): 13350–61. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13350-13361.2005>.
- Samuel Mélanie, Diamond Michael S. 2006. "Pathogenesis of West Nile Virus Infection: A Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion." *Journal of Virology* 80 (19): 9349–60. <https://doi.org/10.1128/JVI.01122-06>.
- Savini G, Monaco F, Calistri P, Lelli R. 2008. "Phylogenetic analysis of West Nile virus isolated in Italy in 2008". *Euro Surveill* 13(48):19048.
- Schaar, Hilde M. van der, Michael J. Rust, Chen Chen, Heidi van der Ende-Metselaar, Jan Wilschut, Xiaowei Zhuang, and Jolanda M. Smit. 2008. "Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells." *PLoS Pathogens* 4 (12): e1000244. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>.
- Schrauf, Sabrina, Christian W. Mandl, Lesley Bell-Sakyi, and Tim Skern. 2009. "Extension of Flavivirus Protein C Differentially Affects Early RNA Synthesis and Growth in Mammalian and Arthropod Host Cells." *Journal of Virology* 83 (21): 11201–10. <https://doi.org/10.1128/JVI.01025-09>.
- Serlin, Yonatan, Ilan Shelef, Boris Knyazer, and Alon Friedman. 2015. "Anatomy and Physiology of the Blood-Brain Barrier." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 38 (February): 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.002>.
- Sevjar, James J, Maryam B Haddad, Bruce C Tierney, and Grant L Campbel. 2003. "Neurologic Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection," 2003. *JAMA* 290(4):511-5. doi: 10.1001/jama.290.4.511.
- Shi, Beller, Wang, Rosales Rosas, De Coninck, Héry, Mousson, Pagès, Raes, Delang, Vega-Rúa, Failloux and Matthijnsens. " Bidirectional Interactions between Arboviruses and the Bacterial and Viral Microbiota in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*". 2022. *American Society of Virology*. 13(5): e01021-22. doi: 10.1128/mbio.01021-22

- Shiryaev, Sergey A., Andrei V. Chernov, Alexander E. Aleshin, Tatiana N. Shiryaeva, and Alex Y. Strongin. 2009. "NS4A Regulates the ATPase Activity of the NS3 Helicase: A Novel Cofactor Role of the Non-Structural Protein NS4A from West Nile Virus." *The Journal of General Virology* 90 (Pt 9): 2081–85. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012864-0>.
- Silva, Aila Solimar Gonçalves, Ana Carolina Diniz Matos, Marcos Antônio Correia Rodrigues da Cunha, Izabelle Silva Rehfeld, Grazielle Consenso Florentino Galinari, Sóstenes Apolo Correia Marcelino, Luis Henrique Gouvêa Saraiva, et al. 2019. "West Nile Virus Associated with Equid Encephalitis in Brazil, 2018." *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (1): 445–53. <https://doi.org/10.1111/tbed.13043>.
- Silverman, Robert H. 2007. "Viral Encounters with 2',5'-Oligoadenylate Synthetase and RNase L during the Interferon Antiviral Response." *Journal of Virology* 81 (23): 12720–29. <https://doi.org/10.1128/JVI.01471-07>.
- Smithburn, K. C., R. M. Taylor, F. Rizk, and A. Kader. 1954. "Immunity to Certain Arthropod-Borne Viruses among Indigenous Residents of Egypt." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 3 (1): 9–18. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1954.3.9>.
- Smithburn, KC, TP Hugues, AW Burke, and JH Paul. 1940. "A NEUROTROPIC VIRUS ISOLATED FROM THE BLOOD OF A NATIVE OF UGANDA," *Am. J. Trop. Med. Hyg.* s1-20, 471–492
- Solana, Rafael, Carmen Campos, Alejandra Pera, and Raquel Tarazona. 2014. "Shaping of NK Cell Subsets by Aging." *Current Opinion in Immunology* 29 (August): 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.04.002>.
- Sotelo, Elena, Jovita Fernandez-Pinero, Francisco Llorente, Montserrat Agüero, Ursula Hoefle, Juan M. Blanco, and Miguel A. Jiménez-Clavero. 2009. "Characterization of West Nile Virus Isolates from Spain: New Insights into the Distinct West Nile Virus Eco-Epidemiology in the Western Mediterranean." *Virology* 395 (2): 289–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.013>.
- Sotelo, José R., Andre B. Sotelo, Fabio J. B. Sotelo, André M. Doi, Joao R. R. Pinho, Rita de Cassia Oliveira, Alanna M. P. S. Bezerra, et al. 2017. "Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy." *Emerging Infectious Diseases* 23 (5): 856–57. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161538>.
- Stamatovic, Svetlana M, Allison M Johnson, Richard F Keep, and Anuska V Andjelkovic. 2016. "Junctional Proteins of the Blood-Brain Barrier: New Insights into Function and Dysfunction." *Tissue Barriers* 4 (1): e1154641. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641>.
- Styer, Linda M., Kim A. Kent, Rebecca G. Albright, Corey J. Bennett, Laura D. Kramer, and Kristen A. Bernard. 2007. "Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts." *PLoS Pathogens* 3 (9): 1262–70. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030132>.
- Suthar, Mehul S., Michael S. Diamond, and Michael Gale. 2013. "West Nile Virus Infection and Immunity." *Nature Reviews. Microbiology* 11 (2): 115–28. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2950>.
- Talero-Gutiérrez, C., A. Rivera-Molina, C. Pérez-Pavajeau, I. Ossa-Ospina, C. Santos-García, M. C. Rojas-Anaya, and A. de-la-Torre. 2018. "Zika Virus Epidemiology: From Uganda to World Pandemic, an Update." *Epidemiology and Infection* 146 (6): 673–79. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000419>.
- Taylor, R. M., H. S. Hurlbut, H. R. Dressler, E. W. Spangler, and D. Thrasher. 1953. "Isolation of West Nile Virus from Culex Mosquitoes." *The Journal of the Egyptian Medical Association* 36 (3): 199–208.
- Toma, Luciano, Micaela Cipriani, Maria Goffredo, Roberto Romi, and Rossella Lelli. 2008. "First Report on Entomological Field Activities for the Surveillance of West Nile Disease in Italy." *Veterinaria Italiana* 44 (3): 483–97, 499–512.
- Turpin J. Thèse. Mécanismes déployés par le virus Zika dans le contrôle de l'apoptose lors de l'infection. 2021.
- Unlu, Isik, Wayne L. Kramer, Alma F. Roy, and Lane D. Foil. 2010. "Detection of West Nile Virus RNA in Mosquitoes and Identification of Mosquito Blood Meals Collected at Alligator Farms in Louisiana." *Journal of Medical Entomology* 47 (4): 625–33. <https://doi.org/10.1603/me09087>.
- Van Slyke, Greta A., Yongqing Jia, Melissa C. Whiteman, Jason A. Wicker, Alan D. T. Barrett, and Laura D.

- Kramer. 2013. "Vertebrate Attenuated West Nile Virus Mutants Have Differing Effects on Vector Competence in *Culex Tarsalis* Mosquitoes." *The Journal of General Virology* 94 (Pt 5): 1069–72. <https://doi.org/10.1099/vir.0.049833-0>.
- Vanlandingham, Dana L., Bradley S. Schneider, Kimberly Klingler, Joseph Fair, David Beasley, Jing Huang, Patricia Hamilton, and Stephen Higgs. 2004. "Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Quantification of West Nile Virus Transmitted by *Culex Pipiens* *Quinquefasciatus*." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (1): 120–23.
- Vaughan, Jefferson A., Robert A. Newman, and Michael J. Turell. 2022. "Bird Species Define the Relationship between West Nile Viremia and Infectiousness to *Culex Pipiens* Mosquitoes." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 16 (10): e0010835. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010835>.
- Vazquez, Ana, Maria Paz Sanchez-Seco, Santiago Ruiz, Francisca Molero, Lourdes Hernandez, Juana Moreno, Antonio Magallanes, Concepcion Gomez Tejedor, and Antonio Tenorio. 2010. "Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain." *Emerging Infectious Diseases* 16 (3): 549–52. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091033>.
- Verma, Saguna, Yeung Lo, Moti Chapagain, Stephanie Lum, Mukesh Kumar, Ulziijargal Gurjav, Haiyan Luo, Austin Nakatsuka, and Vivek R. Nerurkar. 2009. "West Nile Virus Infection Modulates Human Brain Microvascular Endothelial Cells Tight Junction Proteins and Cell Adhesion Molecules: Transmigration across the in Vitro Blood-Brain Barrier." *Virology* 385 (2): 425–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047>.
- Vitek, Christopher J., Stephanie L. Richards, Christopher N. Mores, Jonathan F. Day, and Cynthia C. Lord. 2008. "Arbovirus Transmission by *Culex Nigripalpus* in Florida, 2005." *Journal of Medical Entomology* 45 (3): 483–93. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[483:atbcni\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[483:atbcni]2.0.co;2).
- Vodovar, Nicolas, Alfred W. Bronkhorst, Koen W. R. van Cleef, Pascal Miesen, Hervé Blanc, Ronald P. van Rij, and Maria-Carla Saleh. 2012. "Arbovirus-Derived PiRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells." *PLoS One* 7 (1): e30861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030861>.
- Vries, Liset de, and Alfred T. Harding. 2023. "Mechanisms of Neuroinvasion and Neuropathogenesis by Pathologic Flaviviruses." *Viruses* 15 (2): 261. <https://doi.org/10.3390/v15020261>.
- Wang, E., K. D. Ryman, A. D. Jennings, D. J. Wood, F. Taffs, P. D. Minor, P. G. Sanders, and A. D. Barrett. 1995. "Comparison of the Genomes of the Wild-Type French Viscerotropic Strain of Yellow Fever Virus with Its Vaccine Derivative French Neurotropic Vaccine." *The Journal of General Virology* 76 (Pt 11) (November): 2749–55. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-11-2749>.
- Wang, Haidong, Sandra R. Abbo, Tessa M. Visser, Marcel Westenberg, Corinne Geertsema, Jelke J. Fros, Constantianus J. M. Koenraadt, and Gorben P. Pijlman. 2020. "Competition between Usutu Virus and West Nile Virus during Simultaneous and Sequential Infection of *Culex Pipiens* Mosquitoes." *Emerging Microbes & Infections* 9 (1): 2642–52. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1854623>.
- Wang, Jing, Luhua Qiao, Zhouhua Hou, and Guangxiang Luo. 2017. "TIM-1 Promotes Hepatitis C Virus Cell Attachment and Infection." *Journal of Virology* 91 (2): e01583-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01583-16>.
- Wang, Penghua, Jianfeng Dai, Fengwei Bai, Kok-Fai Kong, Susan J. Wong, Ruth R. Montgomery, Joseph A. Madri, and Erol Fikrig. 2008. "Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain." *Journal of Virology* 82 (18): 8978–85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00314-08>.
- Wang, Tian, Terrence Town, Lena Alexopoulou, John F. Anderson, Erol Fikrig, and Richard A. Flavell. 2004. "Toll-like Receptor 3 Mediates West Nile Virus Entry into the Brain Causing Lethal Encephalitis." *Nature Medicine* 10 (12): 1366–73. <https://doi.org/10.1038/nm1140>.
- Ward, Michael P., James A. Schuermann, Linda D. Highfield, and Kristy O. Murray. 2006. "Characteristics of an Outbreak of West Nile Virus Encephalomyelitis in a Previously Uninfected Population of Horses." *Veterinary Microbiology* 118 (3–4): 255–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.016>.
- Weiss, Nicolas, Florence Miller, Sylvie Cazaubon, and Pierre-Olivier Couraud. 2009. "The Blood-Brain Barrier in Brain Homeostasis and Neurological Diseases." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1788 (4): 842–57.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.10.022>.

Wheeler, Sarah S., Meighan P. Vineyard, Leslie W. Woods, and William K. Reisen. 2012. "Dynamics of West Nile Virus Persistence in House Sparrows (*Passer Domesticus*)." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (10): e1860. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001860>.

Wicker, Jason A., Melissa C. Whiteman, David W. C. Beasley, C. Todd Davis, Charles E. McGee, J. Ching Lee, Stephen Higgs, Richard M. Kinney, Claire Y. -H. Huang, and Alan D. T. Barrett. 2012. "Mutational Analysis of the West Nile Virus NS4B Protein." *Virology* 426 (1): 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.022>.

Wilson, Jason R., Paola Florez de Sessions, Megan A. Leon, and Frank Scholle. 2008. "West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction." *Journal of Virology* 82 (17): 8262–71. <https://doi.org/10.1128/JVI.00226-08>.

Winston, Drew J., Holenarasipur R. Vikram, Ingrid B. Rabe, Gundeep Dhillon, David Mulligan, Johnny C. Hong, Ronald W. Busuttill, et al. 2014. "Donor-Derived West Nile Virus Infection in Solid Organ Transplant Recipients: Report of Four Additional Cases and Review of Clinical, Diagnostic, and Therapeutic Features." *Transplantation* 97 (9): 881–89. <https://doi.org/10.1097/TP.000000000000024>.

Wolburg, Hartwig, and Andrea Lippoldt. 2002. "Tight Junctions of the Blood-Brain Barrier: Development, Composition and Regulation." *Vascular Pharmacology* 38 (6): 323–37. [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00200-8](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00200-8).

Wolf, Roman F., James F. Papin, Rebecca Hines-Boykin, Maria Chavez-Suarez, Gary L. White, Michael Sakalian, and Dirk P. Dittmer. 2006. "Baboon Model for West Nile Virus Infection and Vaccine Evaluation." *Virology* 355 (1): 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.033>.

Work, T. H., H. S. Hurlbut, and R. M. Taylor. 1955. "Indigenous Wild Birds of the Nile Delta as Potential West Nile Virus Circulating Reservoirs." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 4 (5): 872–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1955.4.872>.

Yamshchikov, V. F., and R. W. Compans. 1993. "Regulation of the Late Events in Flavivirus Protein Processing and Maturation." *Virology* 192 (1): 38–51. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1006>.

Yang, Mi-Ran, Sung Ryul Lee, Wonkyung Oh, Eun-Woo Lee, Jung-Yong Yeh, Jin-Ju Nah, Yi-Seok Joo, et al. 2008. "West Nile Virus Capsid Protein Induces P53-Mediated Apoptosis via the Sequestration of HDM2 to the Nucleolus." *Cellular Microbiology* 10 (1): 165–76. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01027.x>.

Ye, Qing, Xiao-Feng Li, Hui Zhao, Shi-Hua Li, Yong-Qiang Deng, Rui-Yuan Cao, Ke-Yu Song, et al. 2012. "A Single Nucleotide Mutation in NS2A of Japanese Encephalitis-Live Vaccine Virus (SA14-14-2) Ablates NS1' Formation and Contributes to Attenuation." *The Journal of General Virology* 93 (Pt 9): 1959–64. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043844-0>.

You, S., and R. Padmanabhan. 1999. "A Novel in Vitro Replication System for Dengue Virus. Initiation of RNA Synthesis at the 3'-End of Exogenous Viral RNA Templates Requires 5'- and 3'-Terminal Complementary Sequence Motifs of the Viral RNA." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (47): 33714–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33714>.

Yu, Yongxin. 2013. "Development of Japanese Encephalitis Attenuated Live Vaccine Virus SA14-14-2 and Its Characteristics." In *Encephalitis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/52980>.

Yun, Sang-Im, Byung-Hak Song, Jin-Kyoung Kim, Gil-Nam Yun, Eun-Young Lee, Long Li, Richard J. Kuhn, Michael G. Rossmann, John D. Morrey, and Young-Min Lee. 2014. "A Molecularly Cloned, Live-Attenuated Japanese Encephalitis Vaccine SA14-14-2 Virus: A Conserved Single Amino Acid in the Ij Hairpin of the Viral E Glycoprotein Determines Neurovirulence in Mice." *PLoS Pathogens* 10 (7): e1004290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004290>.

Zeller, H. G., and I. Schuffenecker. 2004. "West Nile Virus: An Overview of Its Spread in Europe and the Mediterranean Basin in Contrast to Its Spread in the Americas." *European Journal of Clinical Microbiology &*

Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology 23 (3): 147–56. <https://doi.org/10.1007/s10096-003-1085-1>.

Zhou, Hong, N. Jiten Singh, and Kwang S. Kim. 2006. “Homology Modeling and Molecular Dynamics Study of West Nile Virus NS3 Protease: A Molecular Basis for the Catalytic Activity Increased by the NS2B Cofactor.” *Proteins* 65 (3): 692–701. <https://doi.org/10.1002/prot.21129>.

Zhou, Yangsheng, Debashish Ray, Yiwei Zhao, Hongping Dong, Suping Ren, Zhong Li, Yi Guo, Kristen A. Bernard, Pei-Yong Shi, and Hongmin Li. 2007. “Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase.” *Journal of Virology* 81 (8): 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>.

Ziegler, Ute, Renke Lühken, Markus Keller, Daniel Cadar, Elisabeth van der Grinten, Friederike Michel, Kerstin Albrecht, et al. 2019. “West Nile Virus Epizootic in Germany, 2018.” *Antiviral Research* 162: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.12.005>.

Zimler, Rebecca A., and Barry W. Alto. 2021. “The Extrinsic Incubation Period of Zika Virus in Florida Mosquitoes *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus*.” *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (10): 1252. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101252>.

Züst, Roland, Shi-Hua Li, Xuping Xie, Sumathy Velumani, Melissa Chng, Ying-Xiu Toh, Jing Zou, et al. 2018. “Characterization of a Candidate Tetravalent Vaccine Based on 2'-O-Methyltransferase Mutants.” *PLoS ONE* 13 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189262>.

VI. Annexes

1. Réalisation de chimères virales entre les souches du VWN Israël 1998 et Italie 2008

1.1. Séquences chimériques (Séquençage IonTorrent, CIRAD CRVC, Guadeloupe)

1.1.1. Annexe 1 : Séquence IS98-3'UTR

Région 5'UTR

NNNNNNNNNNNNNGTGAGCTGACAACTTAGTAGTGTGGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGC
GAGCTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCG
CGTGTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCCAATACGATT
TGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACCCGAGCAGTGCTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAATAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAGGAACTAGGGACCTTGACC
AGTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATG
ATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTC
ACTGACAGTGACAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCA
AGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAG
CCGTCATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTGCTGCTATTGCTTTTGGT
GGCCCAGCTTACAGC

Protéine E

TTTAACTGCCTTGGAATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC

ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTTGGAGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGGAACCACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTCAAGTTGACGTGCGGTTCATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCTATCTCGTCAGTGGCTTCATT
GAACGACCTAACCGCAGTGGGCAGATTGGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGC
TAAGTCTCTGATTGAATTGGAACCACCCCTTTGGAGACTCATACTAGTGGTGGGCAGAGGGAACAACA
GATTAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCTCAAAGGAA
GCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGT
TGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGAGGAGCATTCCGCTCACTGTTTCGGAGGCATGTCCTGGATAAC
GCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTGATAGGTCCATAGCTCTCAC
GTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCCTCCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GCACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTGTTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAAATGTGGGAA
GCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTTCGTGGTTGAGAAA
CAGGAGGGAAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAACTGGAAATTGGCTGG
AAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGTGGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGAATAGCTTAGAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACCTGAATGTGACTCGAAGATCATT
GGAACGGCTGTCAAGAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCAAT
GATACGTGGAAGCTTGAAGGGCAGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAGACGCATACC
TTGTGGGGCGATGGAATCCTTGGAGAGTACTTGATAATACCAGTCACACTGGCGGGACCACGAAGCAAT
CACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGAGATTGA
CTTCGATTAAGTCCAGGAACCTACGGTCAACCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCCACTC
GCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTGCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCACTGC
GCTACCAAACCTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGACCC
TCGTGCAGTCACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGGGGCAGCTTTCGCAGAATCTAATTC
GGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATAACAACAGTGTGTTATGGTGGCATC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTCTTTCAAATG
GCTTATCACGATGCCCGCCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATTCAGTGGCGGTAGCTT
GGATGATACTGAGAGCCATAACATTACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGTTGATGGTCGGAATAGGCAGCTT
GATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAGAAAGGAGCAAGTCTGCTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTTCAACCCCATGATCCTTGTGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGTAAACGC

Protéine NS2B

GGATGGCCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTCGGCCTAATGTTTGCCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
GCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGCTGCTTTCGTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCTGGGAAAGTGATGCAGAAATTACA
GGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGATGATGATGGAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCAATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGTGTGTTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTT
CCACACCCTTTGGCATAACAACAAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCCTGGACCCATACT
GGGGCAGTGTCAAGGAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAGTGAACGGG
CAGGATGAGGTGCAGATGATTGTGGTGAACCTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAAATCGGGCCGTGACTTTGGACTTCCCCTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAAACGGTGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCCAGCCGGATTGGAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTACTGGATCTCCATCCCGGCGCCGGTAAAAACAAGGAGGATTCTGCC
ACAGATCATCAAAGAGGCCATAAACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGC
TGCTGAGATGGCTGAAGCACTGAGAGGACTGCCCATCCGGTACCAGACATCCGCAGTGCCAGAGAAC
ATAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGTCATGCTACCCTCACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAG
GGTGCCGAACTACAACCTGTTTCGTGATGGATGAGGCTCATTTACCGACCCAGCTAGTATCGCAGCAAG
AGGTTACATTTCCACAAAGGTGAGCTAGGGGAGGCGGGCAATATTCATGACAGCCACCCACCAG
GCACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGAGC
TTGGAECTCTGGATACGAATGGATCACAGAATACACCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAA
GATGGGGAATGAGATTGCCCTTTGCCTACAACGTGCTGGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTC
GTACGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAACAGACATATCTGAA
ATGGGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTGATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACA
GAAGGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCCAGAGACG
TGGACGTATCGGTAGAAATCCGTGCAAGTTGGTGTGATGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGA
CGACTCGAACTTCGCCATTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAAACGGACT
GATCGCTCAATTCTACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGG
AGAAGAGAGGAAAACTTTCTGGAECTGTTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGT
TGCAGCGGCTGGAGTGTACACCACGACCGGAGGTGGTGTCTTTGATGGTCTTAGGACAAACACAATTTT
AGAAGACAACAACGAAGTGAAGTGCATCACGAAGCTTGGTGAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGAT
TGACGCCAGGGTGTACTCGGATCACCAAGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAACGT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAGCACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCA
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTC
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAGATAGGTTTGGGAGGCGCTGTCTTGGGAGTGCAGACCTT
TTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGTTGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATG
ATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGAGACAGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTTGATTT
GTGTCATGACCTTGTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAGATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGGCAAAGAATTGAGGTC
AAGGAGAATTTTCAGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCT
GTGACAACAGCGGTCTCACTCCACTGCTAAAGCATTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGA
CCTCAATAAACGTTTCAGGCAAGTGCCTATTCACTCGCGCAGGCTTCCCCTTCGTGATGTTGGAG
TGTCGGCTCTCCTGCTAGCAGCCGGATGCTGGGGACAAGTCACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCA
ACACTCCTTTTTTCCACTATGCCTACATGGTTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCCAGC
GGCGGACAGCGGCCGGAATCATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGGACGTCCCAGAA
TTAGAGCGCACCCACCCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTCTAGCTG
CAGTAGTAGTGAACCCGTCTGTGAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTGTACAGGCCCGCAGCGGTGA
CGTTTTGGGAGAATGGAGCAAGCTCTGTTTGAACGCAACAACCTGCCATCGGACTCTGCCACATCATGC
GTGGGGTTGGTTGTCATGTCTATCCATAACATGGACTCATAAAGAACATGGAAAAACCAGGACTAAA
AGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAACACGCCAGGAAAGA
AGGCAATGTCCTGAGGGCATTGATCTCTAGGGGCACAGCAAACTGAGATGGCTGGTGAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTGCGAAAAGTGATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCAAAAAAGAGTCCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCAGCATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGACACCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCCCTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAGCATAGGA
CGATTTCGTGTCCTTGAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGCCTGAAGGTGC
TCTGCCCTACATGCCGAAAGTCATAGAGAAGATGGAGCTGCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGGACTG
GTCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCCACGCACGAGATGTATTGGGTGAGTCGAGCTTCAGGCAATGTG
GTACATTGAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTCCTAGGAAGAATGGAAAAAGGACCTGGAAGGGACCC
CAATACGAGGAAGATGTAACCTTGGGAAGTGAACCAAGGGCGGTGGGAAAACCCCTGCTCAACTCAGA
CACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTCGACGTGGCACCACGATGA
GAACCAACCATAGAACCTGGAACATCACGGCAGTTATGATGTGAAGCCACAGGCTCCGCCAGTTT
GCTGGTCAATGGAGTGGTCAAGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAATGTTACCACCATGGC
CATGACTGACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTCAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGA
ACCGCCAGAAGGAGCGAAGTACGTGCTCAACGAGACCACCAACTGGTTGTGGGGCTTTTTGGCCAGAG
AAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAAGAAAGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTG
CCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCCAAAATTTGGGAGA
TGTTGGATGAGGAGCGCGAGGCACATCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATTTACAACATGATGGGA
AAGAGAGAGAAAAACCCGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATTTGGTTCATGTGGCT
CGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTTGGAAAGAAAGAA
CTCAGGAGGAGGTGTCGAGGGCTTGGGCCTCAAACACTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGGCACCC
GGCCTGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATCACGAGAGCTGACTTG
GAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGAAGTGTGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACCCTCATGGATGTT
ATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCCCTAACACTTTTACCAACCTG
GCCGTCCAGCTGGTGAAGATGATGGAAGGGGAAGGAGTATTGGCCAGATGATGTGGAGAACTCAC
AAAAGGGAAAGGACCAAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAAGATGGGGAAGAAAGACTCAGCCGCATGG
CTGTCAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCCACTTCTCA
ATGCTATGTCAAAGGTTTCGAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGATTGGCAGC
AGGTTCCATTTTGTCAAACCATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACACTGGTGGTTCCATG
CCGAGGACAGGATGAATTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGGCCGATGGAACGTCCGCGACA
CTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCAGATGTGGCTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCGGCT

CATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGTCCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTCCAT
CCATGCAGGAGGAGAGTGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTGGATAGAGG
AGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATATTCAGGAAAACGAG
AGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCGAGCCACGTGGGCAGAAAATATCCAGGTG
GCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAGAT
ATGAAGACACAACCTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAG

Région 3'UTR (manque le dernier nucléotide « T »)

ATATTTAATCAATTGTAATAGACAATATAAGTATGCATAAAAGTGTAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGTG
TTAGTGTAATAGTTAAG*AAAAATTTGAGGAGAAAGTCAGGCCGGAAAATTTCCGCCACCGGAAGTTGA
GTAGACGGTGTCTGCCTGCGACTCAACCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGATCCATGT
AAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAACCTCAAAGCCCAATGTCAGACCACG
CTACGGCGTGCCACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGTCCAGGAGGACTGGGTAAACAAAGG
CAAACCAACGCCCCACGCGGCCCTAGCCCTGGTAATGGTGTTAACCAGGGCGAAAGGACTAGAGGTTA
GAGGAGACCCCGCGGTCTGAAGTGCACGGCCAGCCTGGCTGAAGCTGTAGGTGAGGGGAAGGACTA
GAGGTTAGTGGAGACCCCGTGCACAAAACACCACAACAAAACAGCATATTGACACCTGGGATAGACTA
GGAGATCTTCTGCTCTGCACAACCCAGCCACACGGCACAGTGCGCCGACAATGGTGGCTGGTGGTGCGA
GAACACAGGATC

*emplacement théorique du nucléotide « G » supplémentaire dans la séquence Italie 2008 vs Israël 1998

1.1.2. Annexe 2 : Séquence IS98-3'NS4B/NS5

Région 5'UTR

NN
NNNNNNNGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCCG
CGTGTGTCCTTGATTGGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCCAATACGATT
TGTGTTGGCTCTCTTGCGTTCTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACCCGAGCAGTGCTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAATAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAGGAAGTGGGACCTTGACC
AGTGCTATCAATCGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTGTGAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATG
ATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTGCGGTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTC
ACTGACAGTGCAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCA
AGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAG
CCGTCATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTGCGTGCTATTGCTTTTGGT
GGCCCCAGCTTACAGC

Protéine E

TTTAACTGCCTTGAATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC
ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTTGGAGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGAACACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCCTATCTCGTCAGTGGCTTCATT
GAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATTGGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGC
TAAGTCTGATTGAATTGGAACCACCCTTTGGAGACTCATAATAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACA
GATTAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGC
GCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGT
TGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGAGCATTCCGCTCACTGTTCCGGAGGCATGTCCTGGATAAC
GCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTGATAGGTCCATAGCTCTCAC
GTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCTCCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GCACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTGTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAAATGTGGGAA
GCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTGCTGGTTGAGAAA
CAGGAGGGAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAACTGGAAATTGGCTGG
AAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGTGGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGGAAATAGCTTAGAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACCTGAATGTGACTCGAAGATCATT
GGAACGGCTGTCAAGAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCAAT
GATACGTGGAAGCTTGAAGGGCAGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAGACGCATAACC
TTGTGGGCGGATGGAATCCTTGAGAGTGACTTGAATAACCAAGTCAACTGCGGGACCACGAGGATTA
CACAATCGGAGACCTGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGAGATTGA
CTTCGATTAAGTCCCAGGAACACGGTCAACCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCCTGGACCTGCCACTC
GCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTGCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCCTGC

GCTACCAAACACTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGACCC
TCGTGCAGTCACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGGGGCAGCTTTTCGAGAATCTAATTC
GGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATACAACCAGTGTTTATGGTGGCATC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTCTTCAAATG
GCTTATCACGATGCCCGCCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATTCAGTGGCGGTAGCTT
GGATGATACTGAGAGCCATAACATTCACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGTTGATGGTCGGAATAGGCAGCTT
GATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAGAAAGGAGCAAGTCTGCTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTCAACCCCATGATCCTTGCTGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGTAAACGC

Protéine NS2B

GGATGGCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTCCGCCTAATGTTTGCCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
GCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGCTGCTTTCGTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCTGGGAAAGTGCAGAAATTACA
GGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGGATGATGATGGAAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCAATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGTGTGTTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTT
CCACACCCTTTGGCATAACAACAAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCTGGACCCATACT
GGGGCAGTGTCAAGGAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAAGTGAACGGG
CAGGATGAGGTGCAGATGATTGTGGTGGAACTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAATCGGGGCGTGACTTTGGACTTCCCCTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAACGGTGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCCAGCCGGATTGGAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTAAGGATCTCCATCCCGGCGCCGGTAAAACAAGGAGGATTCTGCC
ACAGATCATCAAAGAGGGCCATAAACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGC
TGCTGAGATGGCTGAAGCACTGAGAGGACTGCCATCCGGTACCAGACATCCGCAGTGCCAGAGAAC
ATAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGTCATGCTACCCTCACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAG
GGTGCCGAACATAACCTGTTGCTGATGGATGAGGCTCATTTACCCGACCCAGCTAGTATCGCAGCAAG
AGGTTACATTTCCACAAAGGTGAGCTAGGGGAGGCGGGCAATATTCATGACAGCCACCCACCAG
GCACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGAGC
TTGGAACCTCTGGATACGAATGGATCACAGAATACACCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAA
GATGGGGAATGAGATTGCCCTTTGCCTACAACGTGCTGGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTC
GTACGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAAACAGACATATCTGAA
ATGGGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACA
GAAGGAGAAGGGAGAGTATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCAGAGACG

TGGACGTATCGGTAGAAATCCGTCGCAAGTTGGTGATGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGA
CGACTCGAACTTCGCCATTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAAACGGACT
GATCGCTCAATTCTACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGG
AGAAGAGAGGAAAACTTTCTGGAAGTGTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGT
TGCAGCGGCTGGAGTGTACACCACGACCGGAGGTGGTGTCTTTGATGGTCCTAGGACAAACACAATTTT
AGAAGACAACAACGAAGTGGAAAGTCATCACGAAGCTTGGTGAAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGAT
TGACGCCAGGGTGTACTCGGATCACCAGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAACGT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAGCACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCA
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTC
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAAGATAGGTTTGGGAGGCGCTGTCTTGGGAGTCGCGACCTT
TTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGTTGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATG
ATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGCAGACAGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTGATTT
GTGTCATGACCCTTGTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAGATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGCAAAGAATTGAGGTC
AAGGAGAATTTACAGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCT
GTGACAACAGCGGTCCTCACTCCACTGCTAAAGCATTTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGA
CCTCAATAAACGTTCAAGGCAAGTGCCTATTCACACTCGCGGAGGCTTCCCCTTCGTCGATTTGGAG
TGTCCGCTCTCCTGCTAGCAGCCGGATGCTGGGACAAAGTCAACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCA
ACACTCCTTTTTTGGCACTATGCCTACATGGTTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCAG
CGGCGGACAGCGGCCGGAATCATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGACGTCCAG
AATTAGAGCGCACCCACCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTCTAGC
TGCAGTAGTAGTGAACCCGTCTGTGAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTATCACGGCCGACGCGGT
GACGCTTTGGGAGAATGGAGCAAGCTCTGTTTGAACGCAACAACCTGCCATCGGACTCTGCCACATCAT
GCGTGGGGGTTGGTTGTCCTGCCTATCCATAACATGGACACTCATAAAGAACATGGACAAACCAGGACT
AAAAAGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAGGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTTGATCGCTCAGCAGCAAACACGCCAGGAAAGA
AGGCAATGTCACCGGAGGGTATCCAGTCTCTAGAGGCACAGCAAACCTGAGATGGCTGGTCAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTCGGAAAAGTGATAGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCCAAAAAGAGTTCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCGGACATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGTTGACTCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCTTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAACATAGGAC
GATTCGGGTCTTGAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGTGTGAAGGTGCT
CTGCCCTACATGCCAAAGGTCATAGAGAAGATGGAGCTACTCCAGCGCCGTATGGGGGAGGACTGG
TCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCCACGCACGAGATGACTGGGTAAGTCGAGCTTCAGGCAATGTGG
TACATTCAGTGAACATGACTAGCCAGGTGCTTCTGGGAAGGATGGAGAAGAGGACCTGGAAGGGACCC
CAGTACGAGGAAGATGCAAACCTTGGGAAGTGGAAACCAGGGCGGTGGGGAAACCCTACTCAACTCAGA

CACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTCAACGTGGCACCACGATGA
GAACCACCCATATAGAACCTGGAACCTATCACGGCAGTTATGACGTGAAGCCCACAGGCTCCGCTAGCTC
GCTGGTCAATGGAGTGGTTAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACAAATGTCACCACCATGGC
CATGACTGACACAACCTCCCTTCGGACAGCAGCGGGTGTTCAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGA
ACCGCCAGAAGGAGTGAAGTACGTGCTCAATGAAACCACCAATTGGTTGTGGGCGTTCCTGGCCAGAGA
AAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAAAGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTGC
CATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAAGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCCAAAATTCTGGGAGAT
GGTAGATGAGGAGCGCGAGGCACACCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATCTACAACATGATGGGAA
AGAGAGAGAAAAACCCGGAGAGTTCGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATATGGTTCATGTGGCTC
GGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAAGCTCTGGGCTTTCTCAATGAAGATCACTGGCTTGAAGAAAGAAC
TCAGGAGGAGGTGTCGAGGGCTTGGGCCTCCAAAACCTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGGCACCCG
ACCTGGGGGCAAGATCTATGCTGACGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATCACGAGAGCTGACTTGG
AAAATGAAGCTAAGGTGCTTGGAGCTGCTTGGGGAACATCGGCGTCTTGCCAGGGCCATCATTGAGC
TCACCTATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGATGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAAGTGCATGGATGTCA
TCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTACCTATGCCCTAAACACTTTCACCAACCTGG
CTGTCCAGCTGGTGAGGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGATTGGCCAGATGATGTGGAGAAACTCACA
AAGGGGAAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAGAATGGGGAAGAGAGACTCAGCCGCATGGC
TGTCAGCGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCTCTGGATGATCGCTTTGCCACTTCGCTCCACTTTCTCAAC
GCCATGTCAAAGGTCCGCAAAGACATTCAAGAGTGGAACCATCAACTGGATGGTATGATTGGCAGCAG
GTTCCATTCTGCTCAAACCACTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACATTGGTGGTTCCATGCC
GAGGACAGGACGAACTGGTAGGCAGAGCTCGCATTCTCCAGGGGCGGATGGAACGTCCGCGACACC
GCTTGCTTGGCTAAGTCATACGCCAGATGTGGTTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCGGCTC
ATGGCCAACGCCATCTGCTCCGCTGTCCCTGTGAAGTGGTCCCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NN
NN
NN
NN
NN
NN

Région 3'UTR

Absence de données

1.1.3. Annexe 3 : Séquence IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B

Région 5'UTR

NNNNNNNCCTGTGTGAGCTGACAAA-
CTTAGTAGTGTGGTGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGCGAGCTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCGG
CGTGTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCCAATACGATT

TGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACCCGAGCAGTGCTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAATAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAGGAACTAGGGACCTTGACC
AGTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATG
ATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTCCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTC
ACTGACAGTGACAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCA
AGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAG
CCGTCATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTCTGCTATTGCTTTTGGT
GGCCCCAGCTTACAGC

Protéine E

TTTAACTGCCTTGAATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC
ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTTGGAGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTTATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGAACACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCTATCTCGTCAGTGGCTTCATT
GAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATTGGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGC
TAAGGTCTGATTGAATTGGAACCACCCTTTGGAGACTCATAATAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACA
GATTAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGC
GCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGT
TGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGAGCATTCCGCTCACTGTTCCGGAGGCATGTCCTGGATAAC
GCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTATAGGTCCATAGCTCTCAC
GTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCCTCCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GACACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTGTTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAATGTGGGAA
GCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTCTGTTGAGAAA

CAGGAGGGAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAACTGGAAATTGGCTGG
AAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGTGGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGGAAATAGCTTAGAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACCTGAATGTGACTCGAAGATCATT
GGAACGGCTGTCAAGAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCATT
GATACGTGGAAGCTTGAAGGGCAGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAGACGCATACC
TTGTGGGGCGATGGAATCCTTGAGAGTGACTTGATAATACCAGTCACACTGGCGGGACCACGAAGCAAT
CACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGAGATTGA
CTTCGATTACTGCCCAGGAACTACGGTCACCCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCCACTC
GCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCACTGC
GCTACCAAACCTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGACCC
TCGTGCAGTCACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGGGGCAGCTTTTCGAGAATCTAATTC
GGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATACAACCAGTGTTTATGGTGGCATC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTCTTCAAATG
GCTTATCACGATGCCCGCCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATTCAGTGGCGGTAGCTT
GGATGATACTGAGAGCCATAACATTCACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGTTGATGGTCGGAATAGGCAGCTT
GATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAGAAAGGAGCAAGTCTGCTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTCAACCCCATGATCCTTGCTGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGTAAACGC

Protéine NS2B

GGATGGCCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTCCGCCTAATGTTTGCCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
GCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGCTGCTTTCGTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCTGGGAAAGTGTGCAGAAATTACA
GGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGGATGATGATGGAAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCAATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGCGTGCTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAGGGGGACACGACCACCGGAGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGCGTCT
TCCACACTCTTTGGCATAACAACAAAAGGAGCTGCTTTGATGAGCGGAGAAGGCCGCCTGGACCCATACT
GGGGTAGTGTCAAGGAGGACCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAACTGCAGCATAAGTGAACGGG
CAGGATGAAGTGCAGATGATTGTGGTAGAACCCGGCAAGAACGTCAAAAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAATTGGGGCCGTGACTTTGGACTTCCCACTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAACCGGTGATGTGATCGGGCTCTATGGCAATGGAGTCATAATGCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCAGCAGGATTCGAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTTCTGGATCTTACCCCGGTGCCGGTAAGACAAGGAGGATTCTACC
ACAGATCATTAAAGAGGCCATAAATAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACTAGGGTTGTGGC

TGCTGAGATGGCTGAAGCCTTGAGAGGACTGCCTATCCGGTATCAGACATCTGCAGTGCCCAGAGAACA
CAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGCCATGCCACCCTCACTCACAGGCTGATGTCTCCTCACAGG
GTGCCTAACTACAATCTGTTTGTGATGGATGAGGCTCATTTACCGATCCAGCCAGCATCGCAGCAAGA
GGTATATTTCCACAAAGGTCGAGCTGGGGGAGGCGGCGCAATATTCATGACAGCCACCCCGCCGGG
CACCTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCCATTTCTGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGGGCC
TGGAACTCTGGATACGAATGGATCACAGAATACATCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTGAAAA
TGGGGAATGAGATTGCCCTTTGTCTACAACGTGCCGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTCGTA
TGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAACAGACATATCTGAAATG
GGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTGATCGACAGCAGGAAAAGCGTGAAGCCAACCATCATAACAGA
AGGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACGGCAGCTAGTGCCGCCAGAGACGTG
GACGCATCGGCAGAAATCCGTCGCAAGTTGGTGATGAGTACTGTTATGGAGGGCACACGAATGAAGACG
ACTCGAACTTCGCCCATTTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAAACGGACTGA
TCGCTCAATTTTACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATACACCATGGATGGGGAATACCCGGCTCAGAGGA
AAGAGAGGAAAACTTCCCTGGAATTGTTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGTGG
CAGCGGCTGGAGTGTACATACCACGATCGGAGGTGGTGTTTTACCGCCCTAGGACAAACACGATTTTAG
AAGACAACAACGAAGTGGAAAGTCATCACGAAGCTTGGTGAAAGGAAGATTCTGAGGCCCCGCTGGATTG
ACGCCAGGGTGTACTCGGATCACCAGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTTGCTTCGGGAAAGCGT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTCCTGGGAAAGATGCCTGAACATTTTCATGGGGAAGACGTGGGAAGCC
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCGGATGCTCTCCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTACTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTT
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAGATAGGTCTGGGAGGTATTGTCTTGGGAGTCGCGACCTTC
TTCTGTTGGATGGCTGAAGTTTTCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGCTGTTGCTTTCCCTTCTCTTGATGA
TTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGACAGCGGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTGATTT
GTGTCATGACCCTTGTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAAATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGGCAAAGAATTGAGGTCA
AGGAGAATTTACGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGACCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCTG
TGACCACAGCGGTCTCACTCCACTGCTAAAGCATCTGATCACGTCAGATTACATTAACACTTCATTGAC
CTCAATTAATGTTCAAGCAAGTGCCTATTCACTCGCGCAGGCTTCCCCTTCGTGATGTTGGAGTG
TCAGCTCTTTTGTAGCTGCCGGATGCTGGGACAAGTACCCTCACAGTGACGGTGACAGCGGCAACA
CTTCTGTTCTGCCACTATGCCTACATGGTTCCAGGATGGCAGGCCGAGGCAATGCGCTCAGCCCAGCG
GCGGACAGCGGCTGGAATCATGAAAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGGACGTCCCAGAAT
TAGAGCGCACACCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAAATCATGCTGATCTTGGTGTCTTAGCTGC
AGTAGTAGTAACCCGTCTGTGAAGACAGTGCAGAAAGCTGGAATTTTATCACGGCAGCAGCGGTGAC
GCTTTGGGAGAATGGAGCGAGCTCTGTTTGAACGCAACAACTGCCATCGGACTCTGCCACATCATGCG
TGGGGGTTGGTTGTATGCTATCCATAACATGGACTCATAAAGAACATGGAAAACAGGACTAAAA
AGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAACACGCCAGGAAAGA

AGGCAATGTCACTGGAGGGCATCCAGTCTCTAGGGGCACAGCAAACTGAGATGGCTGGTCTGAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTCTGAAAAGTGATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCAAAAAAGAGTCCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCAGACATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGTGACACCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCCCTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAGCATAGGA
CGATTTCGTGTCCTTGAAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGCCTGAAGGTGC
TCTGCCCCACATGCCGAAAGTCATAGAGAAGATGGAGTGTCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGGACTG
GTCAGAAACCCACTCTCACGGAATCCACGCACGAGATGTATTGGGTGAGTTCAGGCAATGTG
GTACATTTCAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTCCTAGGAAGAATGGAAAAAGGACCTGGAAGGGACCC
CAATACGAGGAAGATGTAACCTGGGAAGTGAACCAAGGGCGGTGGGAAAAACCCCTGCTCAACTCAGA
CACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTCGACGTGGCACCACGATGA
GAACACCCATATAGAACCTGGAACACTACCGCAGTTATGATGTGAAGCCACAGGCTCCGCCATTC
GCTGGTCAATGGAGTGGTTCAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAATGTTACCACCATGGC
CATGACTGACACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTCAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGA
ACCGCCAGAAGGAGCGAAGTACGTGCTCAACGAGACCACCAACTGGTTGTGGGCGTTTTTGGCCAGAG
AAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAAAGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTG
CCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCCAAAATTTTGG-
AGATGGTGGATGAGGAGCGCGAGGCACATCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATTTACAACATGATG
GGAAAGAGAGAGAAAAACCCGGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATTTGGTTCATGTG
GCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTTGAAGAAA
GAACTCAGGAGGAGGTGTCGAGGGCTTGGGCCTCCAAAACCTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGGCA
CCCGGCCTGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATCACGAGAGCTGAC
TTGAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGGAGCTGCTTGTGGAAGTATGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACC
GTCATGGAT
GTTATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCCCTAACACTTTCACCAAC
CTGGCCGTCCAGCTGGTGGAGGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGAATGGCCAGATGATGTGGAGAACT
CACAAAAGGGAAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAAGATGGGGAAGAAAGACTCAGCCGCA
TGGCTGTGAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCCACTTCC
TCAATGCTATGTCAAAGGTTTCGCAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGATTGGCA
GCAGGTTCCATTTTGGCTCAAACCATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACTGGTGGTTCCA
TGCCGAGGACAGGATGAATTTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGCGGATGGAACGTCCGCGA
CACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCAGATGTGGCTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCG
GCTCATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGTCCCTGTGAATTTGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTC
CATCCATGCAGGAGGAGATGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTGGATGAGA
GGAGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATATTCAGGAAAACG
AGAGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCGAGCCACGTGGGCAGAAAACATCCAGG
TGGCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAG
ATATGAAGACACAACCTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAG

Région 3'UTR (manque le dernier nucléotide « T »)

ATATTTAATCAATTGTAATAGACAATATAAGTATGCATAAAAGTGTAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGTG
TTAGTGAAATAGTTAAGAAAATTTTGGAGAGAAAGTCAGGCGGGAAAGTTCCCGCCACCGGAGGTTGA
GTAGACGGTGTGCTGCGACTCAACCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGATCCATGT
AAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAACCTCAAAGCCCAATGTCAGACCACG
CTACGGCGTGTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTCCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAGG
CAAACCAACGCCCCACGCGGCCCTAGCCCCGGTAATGGTGTAAACCAGGGCGAAAGGACTAGAGGTTA
GAGGAGACCCCGCGTTTTAAGTGCACGGCCAGCCTGGCTGAAGCTGTAGGTCAGGGGAAGGACTAG
AGGTTAGTGGAGACCCCGTCCACAAAACACCACAACAAAACAGCATATTGACACCTGGGATAGACTAG
GAGATCTTCTGCTCTGCACAACAGCCACACGGCACAGTGCGCCGACAATGGTGGCTGGTGGTGCAG
AACACAGGATC

1.1.4. Annexe 4 : Séquence IS98-NS2A/NS2B

Région 5'UTR

NNNNNNNNNNNGTGTGAGCTGACAACTTAGTAGTGTGTTGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGCG
AGCTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCCG
CGTGTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCCAATACGATT
TGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACCCGAGCAGTGCTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAATAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAGGAACTAGGGACCTTGACC
AGTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATG
ATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTGCGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTC
ACTGACAGTGCAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCA
AGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAG
CCGTCAATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTGTCGTGCTATTGCTTTTGGT
GCCCCAGCTTACAGC

Protéine E

TTTAACTGCCTTGAATGAGCAACAGAGACTTCTTGAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCCGCGATTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC
ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAACTACTCCACACAGGTTGGAGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGGAACACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCTATCTCGTCAGTGGCTTCATT
GAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATTGGTCACTGTCAACCCTTTGTTTCAGTGGCCACGGCCAACGC
TAAGTCTGATTGAATTGGAACCACCTTTGGAGACTCATACTAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACA

GATTAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGC
GCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGT
TGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTTCGGAGGAGCATTCCGCTCACTGTTTCGGAGGCATGTCCTGGATAAC
GCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTATAGGTCCATAGCTCTCAC
GTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCTCCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GCACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTGTTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAATGTGGGAA
GCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTGCTGGTTGAGAAA
CAGGAGGGAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAACTGGAAATTGGCTGG
AAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGTGGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGAATAGCTTAGAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACACTGAATGTGACTCGAAGATCATT
GGAACGGCTGTCAAGAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCAAT
GATACGTGGAAGCTTAAAAGGGCAGTTCTGGGTGAAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAGACGCATAAC
TTGTGGGGCGATGGAATCCTTGAAGGTGACTTGTGATAATACCAGTCACTGCGGGGACCACGAAGCAAT
CACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGAGATTGA
CTTCGATTACTGCCCAGGAACACTACGGTACCCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCCACTC
GCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTGCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCACTGC
GCTACCAAACACTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGACCC
TCGTGCAGTACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TACAACGCTGATATGATTGATCCTTTTCAGCTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACGGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGGCATTACCTACACTGATGTGTTGCGCTATGTCATCTTGGTGGGAGCAGCTTTCGAGAATCTAATTC
AGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTTAAGGTACAGCCAGTGTGTTATGGTGGC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACACCTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTTTTCAAATG
GCTTACCACGATGCCCGCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATCACTGGCAGTAGCTT
GGATGATATTGAGAGCCATAACATTCACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGTTGCTGGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCCTGAATTTGGATGTGTACAGGATTCTGCTGTTGATGGTCCGAATAGGCAGTTT
GATCAGGGAGAAGAGAAGTGCAGCTGCAAAGAAGAAAGGAGCAAGTCTGTTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTTCAACCCCATGATCCTTGCCGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGCAAACGC

Protéine NS2B

GGGTGGCCCGCAACTGAAGTGAATGACTGCTGTGCGCTTGTGTTTGGCCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
ACTTGACATTGACTCTATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGGCTGCTTTTCTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATCGAGAGGACGGCGGACATCTCCTGGGAAAGTGAATGCAGAAATCACA
GGCTCGAGTGAAGAGTTGATGTGCGGCTTGTGATGATGAAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGGAAAATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCGATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGTGTGTTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTT
CCACACCCTTTGGCATAACAACAAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCTGGACCCATACT
GGGGCAGTGTCAAGGAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAAGTGAACGGG
CAGGATGAGGTGCAGATGATTGTGGTGGAACCTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAATCGGGGCCGTGACTTTGGACTTCCCCACTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAACGGTGTATGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCAGCCGGATTGCAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTACTGGATCTCCATCCCGGCGCCGGTAAAACAAGGAGGATTCTGCC
ACAGATCATCAAAGAGGGCCATAAACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGC
TGCTGAGATGGCTGAAGCACTGAGAGGACTGCCATCCGGTACCAGACATCCGCAGTGCCCAAAGAAC
ATAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGTCATGCTACCCTACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAG
G-
TGCCGAACTACAACCTGTTTCGTGATGGATGAGGCTCATTTCACCGACCCAGCTAGTATCGCAGCAAGAG
GTTACATTTCCACAAAGGTGAGCTAGGGGAGGCGGCGGCAATATTCATGACAGCCACCCACCAGGC
ACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGAGCTT
GAACTCTGGATACGAATGGATCACAGAATACACCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAAGA
TGGGGAATGAGATTGCCCTTTGCCTACAACGTGCTGGAAAGAAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTCGTA
CGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAAACAGACATATCTGAAATG
GGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACAGAA
GGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCCAGAGACGTGG
ACGTATCGGTAGAAATCCGTCGCAAGTTGGTGTGATGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGACGA
CTCGAATTGCCCCATTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAACCGGACTGAT
CGCTCAATTTCTACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGGAGA
AGAGAGGAAAAACTTTCTGGAAGTGTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGTTGC
AGCGGCTGGAGTGTACATACCACGACCCGAGGTTGGTGTCTTTGATGGTCTTAGGACAAACACAATTTAGA
AGACAACAACGAAGTGAAGTCATCACGAAGCTTGGTGAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGATTGA
CGCCAGGGTGTACTCGGATCACCCAGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAACGT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAGCACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCA
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTC
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAAGATAGGTTTGGGAGGCGCTGTCTTGGGAGTCGCGACCTT
TTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGTTGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATG
ATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGACAGACAGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTGATTT
GTGTCATGACCCTTGTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAGATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGGCAAAGAATTGAGGTC
AAGGAGAATTTAGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCT
GTGACAACAGCGTCTCACTCCACTGCTAAAGCATTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGA
CCTCAATAAACGTTTCAGGCAAGTCACTATTCACTCGCGCAGGCTTCCCCTTCGTGATGTTGGAG

TGTCGGCTCTCCTGCTAGCAGCCGGATGCTGGGGACAAGTCACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCA
ACACTCCTTTTTTGGCACTATGCCTACATGGTTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCAG
CGGCGGACAGCGGCCGGAATCATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGGACGTCCAG
AATTAGAGCGCACACACCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTTAGC
TGCAGTAGTAGTGAACCCGTCTGTGAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTATCAGCGCCGACGCGGT
GACGCTTTGGGAGAATGGAGCAAGCTCTGTTTGAACGCAACAACTGCCATCGGACTCTGCCACATCAT
CGTGGGGGTTGGTTGTCATGTCTATCCATAACATGGACTCATAAAGAACATGGAAAAACCAGGACTA
AAAAGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAACACGCCAGGAAAGA
AGGCAATGTCACTGGAGGGCATCCAGTCTCTAGGGGCACAGCAAACCTGAGATGGCTGGTGAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTCGGAAAAGTGATCGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCCAAAAAAGAGTCCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCGGACATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGTGACACCCCTCTTTGTGACATCGGAGAGTCCCTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAGCATAGGA
CGATTCGTGTCCTTGAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTTCGTGAAGGTGC
TCTGCCCTACATGCCGAAAGTCATAGAGAAGATGGAGCTGCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGACTG
GTCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCCACGCACGAGATGTATTGGGTGAGTCGAGCCTCAGGCAATGTG
GTACATTCAAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTCCTAGGAAGAATGGAAAAAGG-
CCTGGAAGGGACCCCAATACGAGGAAGATGTAACTTGGGAAGTGAACCAGGGCGGTGGGAAAACCC
CTGCTCAACTCAGACACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTCGACG
TGGCACCACGATGAGAACCACCCATATAGAACCTGGAACATCACGGCAGTTATGATGTGAAGCCCACA
GGCTCCGCCAGTTCGCTGGTCAATGGAGTGGTCAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAAT
GTTACCACCATGGCCATGACTGACACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTCAAAGAGAAGGTGGAC
ACGAAAGCTCCTGAACCGCCAGAAGGAGCGAAGTACGTGCTCAACGAGACCACCAACTGGTTGTGGGC
GTTTTTGGCCAGAGAAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAAAGGTCAACAGCAAT
GCAGCTTTGGGTGCCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCCA
AAATTTTGG-
AGATGGTGGATGAGGAGCGGAGGCACATCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATTTACAACATGATG
GAAAGAGAGAGAAAAAACCCGGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATTTGGTTCATGTG
GCTCGGAGCTCGTTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTTGAAGAAA
GAACTCAGGAGGAGGTGTGAGGGCTTGGGCCTCCAAAACCTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGGCA
CCCGGCCTGGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATCACGAGAGCTGAC
TTGAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGGAGCTGCTTGGGGAACATCGGCGTCTTGGCAGGGCCATCATT
GAGCTCACCTATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGTGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACCAGTGCATGGAT
GTTATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCCCTAAACACTTTCACCAAC
CTGGCCGTCCAGCTGGTGGAGATGATGGAAGGGGAAGGAGTATTGGCCAGATGATGTGGAGAACT
CACAAAAGGGAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAAGATGGGGAAGAAAGACTCAGCCGCA
TGGCTGTCAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCCACTTCC
TCAATGCTATGTCAAAGGTTCCGAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGATTGGCA
GCAGGTTCCATTTTCTCAAACATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACAACCTGGTGGTTCCA
TGCCGAGGACAGGATGAATTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGCCGGATGGAACGTCCGCGA
CACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCAGATGTGGCTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCG
GCTCATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTATCCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTC
CATCCATGCAGGAGGAGAGTGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTGGATAGA
GGAGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCAGTGGAGAAATGGAGTACGTCATATTGAGGAAAACG
AGAGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCAGCCACGTGGGCAGAAAACATCCAGG
TGGCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAG
ATATGAAGACACAACCTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAG

Région 3'UTR (manque le dernier nucléotide « T »)

ATATTTAATCAATTGTAAATAGACAATATAAGTATGCATAAAAGTGTAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGTG
TTAGTGAAATAGTTAAGAAAATTTTGGAGAGAAAGTCAGGCCGGGAAGTTCCCGCCACCGGAAGTTGA
GTAGACGGTGCTGCCTGCGACTCAACCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGATCCATGT
AAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAACCTCAAAGCCCAATGTCAGACCACG
CTACGGCGTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAAGG
CAAATCAACGCCCCACGCGGCCCTAGCCCCGGTAATGGTGTTAACAGGGCGAAAGGACTAGAGGTTA
GAGGAGACCCCGCGGTTTTAAAGTGCACGGCCAGCCTGGCTGAAGCTGTAGGTCAGGGGAAGGACTAG
AGGTTAGTGAGACCCCGTGCCACAAAACACCACAACAAAACAGCATATTGACACCTGGGATAGACTAG
GAGATCTTCTGCTCTGCACAACCAGCCACACGGCACAGTGCGCCGACAATGGTGGCTGGTGGTGCAG
AACACAGGATC

1.1.5. Annexe 5 : Séquence IS98-NS1

Région 5'UTR

NNNNNNNNNNNTGTGTGAGCTGACAACTTAGTAGTGTGGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGCG
AGCTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCCG
CGTGTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCAATACGATT
TGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACCCGAGCAGTGTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAATAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTTAGTTTTAAGAAGGAACTAGGGACCTTGACC
AGTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGAAGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAACCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATG
ATACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTC
ACTGACAGTGACAGACACCGGAGAAAGCACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCA
AGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAATCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAG
CCGTCAATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACACCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTGCTGCTATTGCTTTTGGT
GGCCCCAGCTTACAGC

Protéine E

TTTAACTGCCTTGAATGAGCAACAGAGACTTCTTGAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTGAATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCGGCCAACCTGGCAGAGGTCCGCGATTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC
ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAA
GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTTGGAGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAGGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGGAACACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTCAAGTTGACGTGCGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCCTATCTCGTCAGTGGCTTCATT
GAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATTGGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGC
TAAGTCTGATTGAATTGGAACCACCTTTGGAGACTCATACTAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACA
GATTAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCTCAAAGGAGC
GCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGT
TGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGAGCATTCCGCTCACTGTTTCGGAGGCATGTCCTGGATAAC
GCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTATAGGTCCATAGCTCTCAC
GTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTCTGCTCTTCTCCTCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GCACTGGGTGTGCTATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTCTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGATACAAGTACTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAAAAAGCCCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGGTCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAAATGTGGGAA
TCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTCTGGTTGAGAAA
CAGGAGGGGAATGTACAAGTCGGCTCCTAAACGTCTCACCGCCACCACGGAAAAATTGGAAATTGGCTGG
AAGCCTGGGGAAAGAGCATCCTATTTGCACCAGAATTGCCAACACACCTTTGTGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGCCCAACTCAGAATCGCGCTTGAATAGCTTGGAAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACCTGAATGTGACTCGAAGATCATC
GGAACGGCCGTCAAAAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCAAT
GATACGTGGAAGCTTGAAGGGCGGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGCACGTGGCCTGAGACGCACAC
CTTGTGGGGCGATGGAATCCTCGAGAGTGACCTGATAATACCAGTCACACTGGCGGGACCACGAAGCA
ACCACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGTGCGGGTAGAGATT
GATTTGATTAAGTCCCAGGGACCACGGTCACCCTGAGTGAAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCCAC
TCGCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTGCTGCAGGAGTTGCACCTTACCACCT
GCGCTACCAGACGGACAGCGGCTGTTGGTATGGCATGGAGATTAGACCACAGAGACATGATGAAAAGA
CCCTCGTGCAGTCACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAAGTTGGGCCTTCTGGTCTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGGGGCAGCTTTTCGAGAATCTAATTC
GGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATACAACCAGTGTGTTATGGTGGCATC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTCTTTCAAATG
GCTTATCACGATGCCCGCCAATTTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATCACTGGCGGTAGCTT

GGATGATACTGAGAGCCATAACATTCAACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGTTGATGGTCGGAATAGGCAGCTT
GATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAAGAAAGGAGCAAGTCTGCTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTCAACCCCATGATCCTTGCTGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGTAAACGC

Protéine NS2B

GGATGGCCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTGCGCCTAATGTTTGCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
GCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGCTGCTTTCGTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCCCTGGGAAAGTGATGCAGAAATTACA
GGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGATGATGATGGAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCAATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGTGTGTTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTT
CCACACCCTTTGGCATAACAACAAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCCTGGACCCATACT
GGGGCAGTGTCAAGGAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAGTGGAACGGG
CAGGATGAGGTGCAGATGATTGTGGTGGAACTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAATCGGGGCCGTGACTTTGGACTTCCCACTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAAACGGTGTATGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCCAGCCGATTGGAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTACTGGATCTCCATCCCAGCCGCGTAAAACAAGGAGGATTCTGCC
ACAGATCATAAAGAGGCCATAAACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGC
TGCTGAGATGGCCGAAGCACTGAGAGGACTGCCATCCGGTACCAGACATCCGCAAGTGCCAGAGAAC
ATAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGTCATGCTACCCTCACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAG
G-
TGCCGAACTACAACCTGTTTCGTGATGGATGAGGCTCATTTACCCGACCCAGCTAGTATCGCAGCAAGAG
GTTACATTTCCACAAAGGTGAGCTAGGGGAGGCGGCGGCAATATTCATGACAGCCACCCACCAGGC
ACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCAGGATCGAGCTT
GGAATCTGGATACGAATGGATCACAGAATACCCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAAGA
TGGGGAATGAGATTGCCCTTTCCTACAACGTGCTGGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTCGTA
CGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAACAGACATATCTGAAATG
GGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACAGAA
GGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCAGAGACGTGG
ACGTATCCGTAGAAATCCGTCGCAAGTTGGTGTGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGACGA
CTCGAATTCGCCATTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAAACGGACTGAT
CGCTCAATTCTACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGGAGA
AGAGAGGAAAAACTTTCTGGAATGTTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGTTGC
AGCGGCTGGAGTGTACACCACGACCGGAGGTGGTGTCTTTGATGGTCTAGGACAAACACAATTTTAGA
AGACAACAACGAAGTGGAAGTCATCACGAAGCTTGGTGAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGATTGA
CGCCAGGGTGTACTCGGATCACCAAGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAACGT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAGCACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCA
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTC
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAAGATAGGTTTGGGAGGCGCTGTCTTGGGAGTCGCGACCTT
TTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGTTGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATG
ATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGAGACAGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTGATTT
GTGTCATGACCCTTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAGATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGCAAAGAATTGAGGTC
AAGGAGAATTTTCAGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCT
GTGACAACAGCGGTCTCACTCCACTGCTAAAGCATTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGA
CCTCAATAAACGTTTCAGGCAAGTGCATTTCACTCGCGCAGGCTTCCCCTTCGTGATGTTGGAG
TGTCGGCTCTCCTGCTAGCAGCCGGATGCTGGGACAAGTCAACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCA
ACACTCCTTTTTTGGCACTATGCCTACATGGTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCCAG
CGGCGGACAGCGGCCGGAATCATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGGACGTCCCAG
AATTAGAGCGCACCCACCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTCTAGC
TGCAGTAGTAGTGAACCCGTCTGTGAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTATCACGGCCGACGCGGT
GACGCTTTGGGAGAATGGAGCAAGCTCTGTTTGGAACGCAACAACCTGCCATCGGACTCTGCCACATCAT
GCGTGGGGGTTGGTTGTCATGTCTATCCATAACATGGACTCATAAAGAACATGGAAAAACCAGGACTA
AAAAGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAACACGCCAGGAAAGA
AGGCAATGTCACTGGAGGGCATTAGTCTCTAGGGGCACAGCAAACCTGAGATGGCTGGTGAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTGCGAAAAGTGATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCCAAAAAGAGTCCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCAGCATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGACACCCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAGCATAGGA
CGATTGCTGCTTGAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGCCTGAAGGTGC
TCTGCCCTACATGCCGAAAGTCATAGAGAAGATGGAGCTGCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGACTG
GTCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCCACGCACGAGATGTATTGGGTGAGTTCGAGCTTCAGGCAATGTG
GTACATTGAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTCCTAGGAAGAATGGAAAAAGGACCTGGAAGGGACCC
CAATACGAGGAAGATGTAACCTTGGGAAGTGAACAGGGCGGTGGGAAAACCCCTGCTCAACTCAGA
CACCAGTAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTCGACGTGGCACCACGATGA
GAACCACCATATAGAACCTGGAACATCACGGCAGTTATGATGTGAAGCCACAGGCTCCGCCAGTTC
GCTGGTCAATGGAGTGGTCAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAATGTTACCACCATGGC
CATGACTGACACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTCAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGA
ACCGCCAGAAGGAGCGAAGTACGTGCTCAACGAGACCACCAACTGGTTGTGGGCGTTTTTGGCCAGAG
AAAAACGTCCAGAAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAAAGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTG
CCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCCAAAATTTTGG-
AGATGGTGGATGAGGAGCGCGAGGCACATCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATTTACAACATGATG
GAAAAGAGAGAGAAAAAACCCGAGAGTTTCGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATTTGGTTGATGTG
GCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACCTGGCTTGAAGAAA
GAACCTCAGGAGGAGGTGTCGAGGGCTTGGCCCTCCAAAACCTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGGCA
CCCAGCTGGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGACACCCGCATCACGAGAGCTGAC
TTGAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGGAGCTGCTTGGTGGGAACATCGGCGTCTTGCCAGGGCCATCATT
GAGCTCACCTATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGTGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACCAGTTCATGGAT

GTTATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCCCTAAACACTTTCACCAAC
CTGGCCGTCCAGCTGGTGAGGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGATTGGCCAGATGATGTGGAGAACT
CACAAAAGGGAAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAGAATGGGGAAGAAAGACTCAGCCGA
TGGCTGTCAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCCACTTCC
TCAATGCTATGTCAAAGGTTGCAAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGATTGGCA
GCAGGTTCCATTTTGGCTCAAACCATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACAAGTGGTGGTTCCA
TGCCGAGGACAGGATGAATTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGGCCGGATGGAACGTCCGCGA
CACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCAGATGTGGCTGCTTCTGTAAGTCCACAGAAGAGACCTGCG
GCTCATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGTCCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTC
CATCCATGCAGGAGGAGAGTGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTGGATAGA
GGAGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATATTCAGGAAAACG
AGAGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCGAGCCACGTGGGCAGAAAACATCCAGG
TGGCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAG
ATATGAAGACACAACCTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAG

Région 3'UTR (incomplète)

ATATTTAATCAATTGTAAATAGACAATATAAGTATGCATAAAAGTGTAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGT
TTAGTGTAATAGTTAAGAAAATTTTGAGGAGAAAAGTCAGGCCGGGG

1.1.6. Annexe 6 : Séquence IS98-5'UTR/C/prM/E

Région 5'UTR

1111111111TGTGTGAGCTGACAACTTAGTAGTGTGGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGCAG
CTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCG

Protéine C

ATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCGGAATGCCCG
CGTGTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCAATGTTGAGCCTGATCGACGGCAAGGGGCCAATACGATT
CGTGTGGCTCTCTTGCGTCTTTCAGGTTACAGCAATTGCTCCGACTCGAGCAGTGTGGATCGATG
GAGAGGTGTGAACAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAAGAAAGAACTAGGGACCTTGACC
AGTGCTATTAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAGACCGGAATTGCAGTCATGATT
GGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCA

Protéine M

GTTACCCTCTCTAACTTTCAAGGGAAAGTTATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTACAGATGTCATCA
CGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAATCTATGCATTGTGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGTGATGA

CACTATCACTTATGAATGCCAGTGCTGTCCGGCCGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCAC
AAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATGGAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGGCCAGTCCGGAGGT
CACTGACAGTGCAGACACACGGAGAAAGCACTCTAGCGAAACAAAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACC
AAGGCCACAAGGTATCTGGTAAAAACAGAATCATGGATCCTGAGGAATCCTGGATATGCTCTGGTGGCA
GCTGTCAATTGGTTGGATGCTTGAAGCAACACCATGCAGCGAGTTGTGTTTGTCTGTATTGCTCTTGG
TGGCTCCAGCCTACAGC

Protéine E

TTCAACTGCCTTGAATGAGCAACAGAGACTTCCTGGAGGGAGTATCCGGAGCAACATGGGTGGATTTG
GTTCTCGAAGGCCGACAGCTGCGTGAATCATGTCCAAGGACAAGCCACCATTGATGTGAAGATGATG
AATATGGAGGCTGCCAACCTGGCAGAGGTCGCGAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCC
ACCAAAGCTGCATGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAACGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGC
AGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGATTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACAC
ATGCGCCAAATTTGCCTGCTCCACCAAGGCAACAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAACATCAAGTATGAA
GTGGCCATCTTTGTCCATGGACCAACCACTGTGGAGTCGCATGGAACTACTCCACACAGATTGGGGCC
ACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGA
GAAGTGACAGTGGACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCCTATTACGTGATGACTGTTGGA
ACAAAGACGTTTTTGGTCCATCGTGAGTGGTTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGCGCTGGAAGT
ACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACGTTAATGGAGTTTGGAGGAACCACACGCCACAAAGCAGTCTGTGATA
GCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATCCCTGTGGAATTTTCAAGC
AACACTGTTAAGTTGACGTGCGGTCAATTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAA
CAACCTACGGCGTCTGTTCAAAGGCATTCAAGTTTCTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTG
TGGTGTGGAAATTGCAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTTCCCATTTTCGTGAGTGGCTTCTT
GAACGACCTAACACCGGTGGGCAGATTGGTCACTGTTAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAATGC
CAAGGTCCTGATTGAATTGGAACCACCTTTTGGAGACTCATACATAGTGGTAGGTAGAGGAGAACAACAG
ATCAATCACCATTGGCATAAGTCTGGAAGCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACTCTCAAGGGGGCG
CAGAGATTAGCCGCTCTAGGAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGTA
GGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGGTGGAGCGTTTCGCTCACTGTTTGGAGGCATGTCCTGGATAACG
CAGGGATTACTGGGGGCTCTTCTGTTGTGGATGGGCATCAATGCTCGTGACAGGTCCATAGCTCTCAGC
TTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCTCCTCCTCGTGAACGTGCACGCT

Protéine NS1

GACACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGTGGAGTGTTTCATACACAAT
GATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAGGCCTAGCCAAGATCATT
CAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGAGCATCAAATGTGGGAA
GCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGTGTCTGGTTGAGAAA
CAAGAGGGAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAACTGGAAATTGGCTGG
AAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGTGGTTGATGGTCCG
GAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGGAAATAGCTTAGAAGTGGAGGATTTTGGATTTGGT
CTCACCAGCACTCGGATGTTCTGAAGGTGAGAGAGCAACACAACCTGAATGTGACTCGAAGATCATT
GGAACGGCTGTCAAGAACAACCTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAGCAGGCTCAAT
GATACGTGGAAGCTTGAAGGGCAGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAGACGCATAACC
TTGTGGGGCGATGGAATCCTTGGAGTGAATGATAATACCAGTCACACTGGCGGGACCACGAAGCAAT
CACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGAGATTGA
CTTCGATTACTGCCAGGAACACTACGGTACCCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCCACTC
GCACCACACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGTCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCACTGC
GCTACCAAACCTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGACCC
TCGTGCAGTACAAGTGAATGCT

Protéine NS2A

TATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCC
TTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGATTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTGTTG
GGGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGGGGCAGCTTTCGCAGAATCTAATTC
GGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATAACAACAGTGTGTTATGGTGGCATC
GTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTGATGTTGGCGGCTGTTTTCTTTCAAATG
GCTTATCACGATGCCCGCCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGTGTTGAATTCAGTGGCGGTAGCTT
GGATGATACTGAGAGCCATAACATTACAACGACATCAAACGTGGTTGTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAAC
ACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGTTGATGGTCGGAATAGGCAGCTT
GATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAGAAAGGAGCAAGTCTGCTATGCTTGGCTCTAGCCTC
AACAGGACTTTTTCAACCCCATGATCCTTGGCTGCTGGACTGATTGCATGTGATCCCAACCGTAAACGC

Protéine NS2B

GGATGGCCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTCCGCCTAATGTTTGCATCGTCGGAGGGCTGGCAGA
GCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGCTGCTTTCGTGATTTCT
GGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCCCTGGGAAAGTGATGCAGAAATTACA
GGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGGATGATGATGGAAACTTCCAGCTCATGAATGATCCAGGA
GCACCTTGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACACCCCTGGGCAATC
TTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGA

Protéine NS3

GGAGGTGTGTTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTA
CAGGATCATGACTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTT
CCACACCCTTTGGCATAACAACAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCTGGACCCATACT
GGGGCAGTGTCAAGGAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAGTGGAAACGGG
CAGGATGAGGTGCAGATGATTGTGGTGGAACTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGG
GGTGTTCAAAACACCTGAAGGAGAAATCGGGGCGGTGACTTTGGACTTCCCACTGGAACATCAGGCTC
ACCAATAGTGGACAAAACGGTGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCAACGGCTC
ATACATAAGCGCGATAGTGCAGGGTGAAGGATGGATGAGCCAATCCAGCCGGATTGCAACCTGAGAT
GCTGAGGAAAAACAGATCACTGTACTGGATCTCCATCCCGGCGCCGGTAAAACAAGGAGGATTCTGCC
ACAGATCATCAAAGAGGCCATAAACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGC
TGCTGAGATGGCTGAAGCACTGAGAGGACTGCCATCCGGTACCAGACATCCGCAGTGCCAGAGAAC
ATAATGGAAATGAGATTGTTGATGTCATGTGTCATGCTACCCTACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAG
G-
TGCCGAACTACAACCTGTTTCGTGATGGATGAGGCTCATTTACCCGACCCAGCTAGTATCGCAGCAAGAG
GTTACATTTCCACAAAGGTGAGCTAGGGGAGGCGGGCGGCAATATTCATGACAGCCACCCACCAGGC
ACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAATTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGAGCTT
GGAATCTGGATACGAATGGATCACAGAATACCCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAAGA
TGGGGAATGAGATTGCCCTTTGCCTACAACGTGCTGGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTCGTA
CGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAACGATGATTGGGACTTTGTTATCACAAACAGACATATCTGAAATG
GGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACAGAA
GGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAACCATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCAGAGACGTGG
ACGTATCGGTAGAAATCCGTGCAAGTTGGTGTGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGACGA
CTCGAATTCGCCATTGGACTGAGGCACGAATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAACCGGACTGAT
CGCTCAATTCACCAACCAGAGCGTGAGAAGGTATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGGAGA

AGAGAGGAAAACTTTCTGGAAGTGTGAGGACTGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGTTGC
AGCGGCTGGAGTGTACATACCACGACCGGAGGTGGTGCTTTGATGGTCCTAGGACAAACACAATTTAGA
AGACAACAACGAAGTGGAAATCATCACGAAGCTTGGTGAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGATTGA
CGCCAGGGTGTACTCGGATCACCGGCACTAAAGGCGTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAAAGCT

Protéine NS4A

TCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAGCACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCA
CTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAAGAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGA
ACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAGTGTGATGACCATGGGAGTATTCTTC
CTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAGATAGGTTTGGGAGGCGCTGTCTTGGGAGTCGCGACCTT
TTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGTTGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATG
ATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTTCGAGACAGACAACCAGCTAGCCGTGTTCTGATTT
GTGTCATGACCCTTGAGCGCAGTGGCAGCC

Protéine NS4B

AACGAGATGGGTTGGCTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTGGGCAAAGAATTGAGGTC
AAGGAGAATTTACGCATGGGAGAGTTTCTTCTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCT
GTGACAACAGCGGTCTCACTCCACTGCTAAAGCATTTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGA
CCTCAATAAACGTTTCAGGCAAGTGCATTTCACTCGCGCAGGCTTCCCCTTCGTCGATGTTGGAG
TGTCGGCTCTCCTGCTAGCAGCCGGATGCTGGGACAAGTCAACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCA
ACACTCCTTTTTTGGCACTATGCCTACATGGTTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCCAG
CGCGGACAGCGGCCGGAATCATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGCCACGACGTCCTCCAG
AATTAGAGCGCACCCACCCATCATGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTCTAGC
TGCAGTAGTAGTGAACCCGTCTGTGAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTGATCACGGCCGACGCGGT
GACGCTTTGGGAGAATGGAGCAAGCTCTGTTTGAACGCAACAACCTGCCATCGGACTCTGCCACATCAT
GCGTGGGGGTTGGTTGTCATGTCTATCCATAACATGGACACTCATAAAGAACATGGAAAAACCAGGACTA
AAAAGA

Protéine NS5

GGTGGGGCAAAGGACGCACCTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGA
GTTCACTAGGTACCGCAAAGAGGCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAACACGCCAGGAAAGA
AGGCAATGTCACTGGAGGGCATTAGTCTCTAGGGGCACAGCAAACTGAGATGGCTGGTGAACGGA
GGTTTCTCGAACCGGTGCGAAAAGTGATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTACTATATGG
CAACCCAAAAAGAGTCCAAGAAGTCAGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCAGCATGAAGAGCCCCAA
CTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTGTCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTG
AGTGTGACACCCTCCTTTGTGACATCGGAGAGTCTCGTCAAGTGTGAGGTTGAAGAGCATAGGA
CGATTGCTGCTTGAATGGTTGAGGACTGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGCCTGAAGGTGC
TCTGCCCTACATGCCGAAAGTCATAGAGAAGATGGAGCTGCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGACTG
GTCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCACGCACGAGATGTATTGGGTGAGTTCGAGCTTCAGGCAATGTG
GTACATTAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTCCTAGGAAGAATGGAAAAAGGACCTGGAAGGGACCC
CAATACGAGGAAGATGTAACCTTGGGAAGTGAACAGGGCGGTGGGAAAACCCCTGCTCAACTCAGA
CACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAGGCGTGAGTACAGTTTCGACGTGGCACCACGATGA
GAACCACCATATAGAACCTGGAACATCACGGCAGTTATGATGTGAAGCCACAGGCTCCGCCAGTTC
GCTGGTCAATGGAGTGGTCAGGCTCCTCTCAAACCATGGGACACCATCACGAATGTTACCACCATGGC

CATGACTGACACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTTCAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGA
ACCGCCAGAAGGAGCGAAGTACGTGCTCAACGAGACCACCAACTGGTTGTGGGCGTTTTTGGCCAGAG
AAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAAAAGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTG
CCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGCAGTTGAAGATCAAATTT----
GGAGATGGTGGATGAGGAGCGCGAGGACACATCTGCGGGGGGAATGTCACACTTGCATTTACAACATGA
TGGGAAAGAGAGAGAAAAAACC CGGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCAGAGCCATTTGGTTCATG
TGGCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGACCACTGGCTTGAAGA
AAGAACTCAGGAGGAGGTGTGAGGGCTTGGGCCTCCAAAACCTGGGTTACATCCTGCGTGAAGTTGG
CACCCGGCCTGGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCATCACGAGAGCTG
ACTTGGAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGAGCTGCTTGATGGGGAACATCGGCGTCTTGCCAGGGCCATCA
TTGAGCTCACCTATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGATGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGAACCCTCATGG
ATGTTATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTACCTACGCCCTAAACACTTTACACAA
CCTGGCCGTCCAGCTGGTGAAGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGATTGGCCAGATGATGTGGAGAAAC
TCACAAAAGGGAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAGAATGGGGAAGAAAGACTCAGCCGC
ATGGCTGTCAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCCACTTC
CTCAATGCTATGTCAAAGTTTCGCAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGATTGGC
AGCAGGTTCCATTTTGTCAAACCATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACACTGGTGGTTCC
ATGCCGAGGACAGGATGAATTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGCGGATGGAACGTCCGCG
ACACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCAGATGTGGCTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCTGCG
GCTCATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGTCCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGGTC
CATCCATGCAGGAGGAGAGTGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTGGATAGA
GGAGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCCAAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATATTCAGGAAAACG
AGAGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCGAGCCACGTGGGCAGAAAACATCCAGG
TGGCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAG
ATATGAAGACACAACCTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAG

Région 3'UTR

ATATTTAATCAATTGTAAATAGACAATATAAGTATGCATAAAAGTG TAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGTG
TTAGTGTAATAGTTAAGAAAATTTT GAGGAGAAAAGTCAGGCCGGGAAGTTCCCGCCACCGGAAGTTGA
GTAGACGGTGCTGCCTGCGACTCAACCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGATCCATGT
AAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAAGGAGGACCCACATGTTGTAACCTTCAAAGCCCAATGTCAGACCACG
CTACGGCGTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAGG
CAAATCAACGCCCCACGCGGCCCTAGCCCCGGAATGGTGTTAACCAGGGCGAAAGGACTAGAGGTTA
GAGGAGACCCCGCGTTTTAAGTGCACGGCCAGCCTGGCTGAAGCTGTAGGTCAGGGGAAGGACTAG
AGGTTAGTGGAGACCCCGTGCCACAAAACACCACAACAAAACAGCATATTGACACCTGGGATAGACTAG
GAGATCTTCTGCTCTGCACAACCAGCCACACGGCACAGTGCGCCGACAATGGTGGCTGGTGGTGCAG
AAACACAGGATC

1.2. Comparaison des mutations entre les chimères et la séquence parentale Israël 1998

Les annexes 7 à 12 rassemblent l'ensemble des mutations, synonymes ou non-synonymes retrouvées sur les différentes chimères, comparativement à la souche parentale Israël 1998. En bleu sont surlignées les mutations non attendues (absente du design initial) et absentes du génome parental Italie 2008 (donc des mutations potentiellement dues à des erreurs de polymérase). En rouge, les mutations non attendues dans le design initial mais cependant présentes sur le génome Italie 2008, potentiellement dues à la présence de quasi-espèces au sein de la population virale.

1.2.1. Annexe 7 : Séquence chimérique IS98-3'UTR vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08																																																																																																																		
IS98	NS4B	7273-7275	120	TGC	Cystéine	NS	NON	NON																																																																																																																		
CH1				TTC	Phénylalanine				IS98	NS5	10279-10281	867	AAC	Asparagine	S	NON	OUI	CH1	AAT	Asparagine	IS98	3'UTR	10517		G			OUI		CH1	A		IS98	3'UTR	10520		G			OUI		CH1	A		IS98	3'UTR	10523		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10689		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A	
IS98	NS5	10279-10281	867	AAC	Asparagine	S	NON	OUI																																																																																																																		
CH1				AAT	Asparagine				IS98	3'UTR	10517		G			OUI		CH1	A		IS98	3'UTR	10520		G			OUI		CH1	A		IS98	3'UTR	10523		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10689		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G							
IS98	3'UTR	10517		G			OUI																																																																																																																			
CH1				A					IS98	3'UTR	10520		G			OUI		CH1	A		IS98	3'UTR	10523		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10689		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																			
IS98	3'UTR	10520		G			OUI																																																																																																																			
CH1				A					IS98	3'UTR	10523		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10689		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																															
IS98	3'UTR	10523		C			OUI																																																																																																																			
CH1				T					IS98	3'UTR	10689		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																											
IS98	3'UTR	10689		T			OUI																																																																																																																			
CH1				C					IS98	3'UTR	10721		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																																							
IS98	3'UTR	10721		C			OUI																																																																																																																			
CH1				T					IS98	3'UTR	10775		C			OUI		CH1	T		IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																																																			
IS98	3'UTR	10775		C			OUI																																																																																																																			
CH1				T					IS98	3'UTR	10830		T			OUI		CH1	C		IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																																																															
IS98	3'UTR	10830		T			OUI																																																																																																																			
CH1				C					IS98	3'UTR	10832		A			OUI		CH1	G		IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																																																																											
IS98	3'UTR	10832		A			OUI																																																																																																																			
CH1				G					IS98	3'UTR	10852		A			OUI		CH1	G																																																																																																							
IS98	3'UTR	10852		A			OUI																																																																																																																			
CH1				G																																																																																																																						

1.2.2. Annexe 8 : Séquence IS98-3'NS4B/NS5 vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08
IS98	NS4B	7621-7623	236	TCA	Sérine	S	OUI	OUI
CH2				TCC	Sérine			
IS98	NS4B	7624-7626	237	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI
CH2				TGC	Cystéine			
IS98	NS4B	7660-7662	249	GAA	Acide glutamique	NS	OUI	OUI
CH2				GAC	Acide aspartique			
IS98	NS5	7744-7746	22	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH2				GAG	Acide glutamique			
IS98	NS5	7783-7785	35	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH2				GTT	Valine			
IS98	NS5	7795-7797	39	GCG	Alanine	S	OUI	OUI
CH2				GCA	Alanine			
IS98	NS5	7828-7830	50	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI
CH2				ACC	Thréonine			
IS98	NS5	7837-7839	53	CAT	Histidine	NS	OUI	OUI
CH2				TAT	Tyrosine			
IS98	NS5	7840-7842	54	TCA	Sérine	NS	OUI	OUI
CH2				CCA	Proline			
IS98	NS5	7849-7851	57	AGG	Arginine	S	OUI	OUI
CH2				AGA	Arginine			
IS98	NS5	7912-7914	78	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH2				ATA	Isoleucine			
IS98	NS5	7969-7971	97	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH2				GTT	Valine			
IS98	NS5	8128-8130	150	TCC	Sérine	S	OUI	OUI
CH2				TCT	Sérine			
IS98	NS5	8152-8154	158	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH2				GAA	Acide glutamique			
IS98	NS5	8167-8169	163	CGT	Arginine	S	OUI	OUI
CH2				CGG	Arginine			
IS98	NS5	8218-8220	180	TGC	Cystéine	S	OUI	OUI
CH2				TGT	Cystéine			
IS98	NS5	8245-8247	189	CCG	Proline	S	OUI	OUI
CH2				CCA	Proline			
IS98	NS5	8248-8250	190	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
CH2				AAG	Lysine			
IS98	NS5	8269-8271	197	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH2				CTA	Leucine			
IS98	NS5	8275-8277	199	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
CH2				CAG	Glutamine			
IS98	NS5	8290-8292	204	GGG	Glycine	S	OUI	OUI
CH2				GGA	Glycine			
IS98	NS5	8338-8340	220	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH2				TAC	Tyrosine			
IS98	NS5	8344-8346	222	GTG	Valine	S	OUI	OUI
CH2				GTA	Valine			
IS98	NS5	8380-8382	234	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH2				AAC	Asparagine			
IS98	NS5	8386-8388	236	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI
CH2				ACT	Thréonine			
IS98	NS5	8398-8400	240	CTC	Leucine	S	OUI	OUI
CH2				CTT	Leucine			
IS98	NS5	8401-8403	241	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH2				CTG	Leucine			
IS98	NS5	8407-8409	243	AGA	Arginine	S	OUI	OUI
CH2				AGG	Arginine			
IS98	NS5	8413-8415	245	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH2				GAG	Acide glutamique			
IS98	NS5	8416-8418	246	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
CH2				AAG	Lysine			
IS98	NS5	8437-8439	253	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
CH2				CAG	Glutamine			
IS98	NS5	8452-8454	258	GTA	Valine	NS	OUI	OUI
CH2				GCA	Alanine			
IS98	NS5	8464-8466	262	AGC	Sérine	S	OUI	OUI
CH2				AGT	Sérine			
IS98	NS5	8482-8484	268	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
CH2				GGG	Glycine			
IS98	NS5	8491-8493	271	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH2				CTA	Leucine			
IS98	NS5	8518-8520	280	AAC	Asparagine	NS	OUI	OUI
CH2				AAG	Lysine			
IS98	NS5	8554-8556	292	TCG	Sérine	S	OUI	OUI
CH2				TCA	Sérine			
IS98	NS5	8614-8616	312	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI
CH2				GAC	Acide aspartique			
IS98	NS5	8635-8637	319	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
CH2				GCT	Alanine			
IS98	NS5	8638-8640	320	AGT	Sérine	S	OUI	OUI
CH2				AGC	Sérine			
IS98	NS5	8659-8661	327	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH2				GTT	Valine			
IS98	NS5	8692-8694	338	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
CH2				ACA	Thréonine			
IS98	NS5	8698-8700	340	GTT	Valine	S	OUI	OUI
CH2				GTC	Valine			
IS98	NS5	8722-8724	348	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI
CH2				ACA	Thréonine			
IS98	NS5	8734-8736	352	GGG	Glycine	S	OUI	OUI
CH2				GGA	Glycine			
IS98	NS5	8743-8745	355	CGA	Arginine	S	OUI	OUI
CH2				CGG	Arginine			
IS98	NS5	8794-8796	372	GCG	Alanine	NS	OUI	OUI
CH2				GTG	Valine			

IS98									
CH2	NS5	8809-8811	377	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	
				AAT	Asparagine				
IS98	NS5	8812-8814	378	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	
CH2				GAA	Acide glutamique				
IS98	NS5	8821-8823	381	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	
CH2				AAT	Asparagine				
IS98	NS5	8836-8838	386	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI	
CH2				TTC	Phénylalanine				
IS98	NS5	8839-8841	387	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	
CH2				CTG	Leucine				
IS98	NS5	8944-8946	422	AGG	Arginine	NS	OUI	OUI	
CH2				AAG	Lysine				
IS98	NS5	8977-8979	433	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI	
CH2				TTC	Phénylalanine				
IS98	NS5	8989-8991	437	GTG	Valine	S	OUI	OUI	
CH2				GTA	Valine				
IS98	NS5	9010-9012	444	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	
CH2				CAC	Histidine				
IS98	NS5	9037-9039	453	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	
CH2				ATC	Isoleucine				
IS98	NS5	9106-9108	476	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	
CH2				ATA	Isoleucine				
IS98	NS5	9145-9147	489	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	
CH2				GAA	Acide glutamique				
IS98	NS5	9154-9156	492	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	
CH2				GGC	Glycine				
IS98	NS5	9169-9171	497	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	
CH2				GAT	Acide aspartique				
IS98	NS5	9259-9261	527	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	
CH2				CGA	Arginine				
IS98	NS5	9283-9285	535	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	
CH2				GAC	Acide aspartique				
IS98	NS5	9451-9453	591	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	
CH2				ACT	Thréonine				
IS98	NS5	9463-9465	595	GTT	Valine	S	OUI	OUI	
CH2				GTC	Valine				
IS98	NS5	9508-9510	610	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	
CH2				TAT	Tyrosine				
IS98	NS5	9535-9537	619	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	
CH2				GCT	Alanine				
IS98	NS5	9604-9606	642	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	
CH2				AAG	Lysine				
IS98	NS5	9652-9654	658	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI	
CH2				GAG	Acide glutamique				
IS98	NS5	9676-9678	666	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	
CH2				AGC	Sérine				
IS98	NS5	9700-9702	674	CCC	Proline	S	OUI	OUI	
CH2				CCT	Proline				
IS98	NS5	9706-9708	676	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	
CH2				GAT	Acide aspartique				
IS98	NS5	9721-9723	681	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	
CH2				ACT	Thréonine				
IS98	NS5	9733-9735	685	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI	
CH2				TTC	Phénylalanine				
IS98	NS5	9739-9741	687	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	
CH2				AAC	Asparagine				
IS98	NS5	9742-9744	688	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	
CH2				GCC	Alanine				
IS98	NS5	9754-9756	692	GTT	Valine	S	OUI	OUI	
CH2				GTC	Valine				
IS98	NS5	9766-9768	696	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	
CH2				ATT	Isoleucine				
IS98	NS5	9781-9783	701	CCG	Proline	S	OUI	OUI	
CH2				CCA	Proline				
IS98	NS5	9817-9819	713	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI	
CH2				TTC	Phénylalanine				
IS98	NS5	9829-9831	717	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	
CH2				CAC	Histidine				
IS98	NS5	9865-9867	729	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	
CH2				TTG	Leucine				
IS98	NS5	9889-9891	737	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	
CH2				GAC	Acide aspartique				
IS98	NS5	9895-9897	739	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	
CH2				CTG	Leucine				
IS98	NS5	9913-9915	745	ATA	Isoleucine	S	OUI	OUI	
CH2				ATT	Isoleucine				
IS98	NS5	9946-9948	756	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	
CH2				ACC	Thréonine				
IS98	NS5	9952-9954	758	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	
CH2				TGC	Cystéine				
IS98	NS5	9955-9957	759	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	
CH2				TTG	Leucine				
IS98	NS5	9964-9966	762	TCT	Sérine	S	OUI	OUI	
CH2				TCA	Sérine				
IS98	NS5	9967-9969	763	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	
CH2				TAC	Tyrosine				
IS98	NS5	9982-9984	768	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	
CH2				TTG	Leucine				
IS98	NS5	10030-10032	784	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	
CH2				ATC	Isoleucine				
IS98	NS5	10051-10052	791	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	
CH2				AAC	Asparagine				

1.2.3. Annexe 9 : Séquence chimérique IS98-3'NS2B/NS3/NS4A/NS4B vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3088-3090	207	AAT	Asparagine	NS	NON	NON																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ATT	Isoleucine				IS98	NS3	4615-4617	2	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGC	Glycine	IS98	NS3	4621-4623	4	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4672-4674	21	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGA	Glycine	IS98	NS3	4741-4743	44	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGC	Glycine	IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine
IS98	NS3	4615-4617	2	GGT	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GGC	Glycine				IS98	NS3	4621-4623	4	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4672-4674	21	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGA	Glycine	IS98	NS3	4741-4743	44	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGC	Glycine	IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine						
IS98	NS3	4621-4623	4	TTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTG	Leucine				IS98	NS3	4672-4674	21	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGA	Glycine	IS98	NS3	4741-4743	44	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGC	Glycine	IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																		
IS98	NS3	4672-4674	21	GGC	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GGA	Glycine				IS98	NS3	4741-4743	44	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGC	Glycine	IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																														
IS98	NS3	4741-4743	44	GGT	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GGC	Glycine				IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																										
IS98	NS3	4744-4746	45	GTT	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GTC	Valine				IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																						
IS98	NS3	4753-4755	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ACT	Thréonine				IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCT	Alanine	IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																		
IS98	NS3	4777-4779	56	GCC	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GCT	Alanine				IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																														
IS98	NS3	4795-4797	62	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GAA	Acide glutamique				IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																										
IS98	NS3	4819-4821	70	GGC	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GGT	Glycine				IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAC	Acide aspartique	IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																						
IS98	NS3	4834-4836	75	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GAC	Acide aspartique				IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine	IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																		
IS98	NS3	4864-4866	85	TTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTG	Leucine				IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAT	Histidine	IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																														
IS98	NS3	4870-4872	87	CAC	Histidine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CAT	Histidine				IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI	CH3	GAA	Acide glutamique	IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																										
IS98	NS3	4891-4893	94	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GAA	Acide glutamique				IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTA	Valine	IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																						
IS98	NS3	4909-4911	100	GTG	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GTA	Valine				IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCC	Proline	IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	4915-4917	102	CCT	Proline	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CCC	Proline				IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTC	Valine	IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	4927-4929	106	GTT	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GTC	Valine				IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAA	Lysine	IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	4930-4932	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				AAA	Lysine				IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	4978-4980	123	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ATT	Isoleucine				IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATC	Isoleucine	IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5050-5052	147	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ATC	Isoleucine				IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTC	Leucine	IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5056-5058	149	CTT	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTC	Leucine				IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCA	Alanine	IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5140-5142	177	GCC	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GCA	Alanine				IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI	CH3	GTT	Valine	IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5182-5184	191	GTA	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GTT	Valine				IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTT	Leucine	IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5191-5193	194	CTC	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTT	Leucine				IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5194-5196	195	CAT	Histidine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CAC	Histidine				IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH3	GGT	Glycine	IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5200-5202	197	GGC	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GGT	Glycine				IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI	CH3	AAG	Lysine	IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5209-5211	200	AAA	Lysine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				AAG	Lysine				IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTA	Leucine	IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5224-5226	205	CTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTA	Leucine				IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5236-5238	209	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ATT	Isoleucine				IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5251-5253	214	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				AAT	Asparagine				IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5284-5286	225	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ACT	Thréonine				IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5314-5316	235	GCA	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GCC	Alanine				IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	TTG	Leucine	IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5317-5319	236	CTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TTG	Leucine				IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5329-5331	240	CCC	Proline	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CCT	Proline				IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5338-5340	243	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TAT	Tyrosine				IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI	CH3	TCT	Sérine	IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5347-5349	246	TCC	Sérine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TCT	Sérine				IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH3	CAC	Histidine	IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5365-5367	252	CAT	Histidine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CAC	Histidine				IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH3	TGC	Cystéine	IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5395-5397	262	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TGC	Cystéine				IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5401-5403	264	GCT	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GCC	Alanine				IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI	CH3	ACT	Thréonine	IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5410-5412	267	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				ACT	Thréonine				IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH3	CCT	Proline	IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5440-5442	277	CCG	Proline	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CCT	Proline				IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI	CH3	AAT	Asparagine	IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5449-5441	280	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				AAT	Asparagine				IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI	CH3	TTT	Phénylalanine	IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5455-5457	282	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TTT	Phénylalanine				IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH3	GAT	Acide aspartique	IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5482-5484	291	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GAT	Acide aspartique				IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH3	GCC	Alanine	IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS3	5488-5490	293	GCT	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				GCC	Alanine				IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH3	AGC	Isoleucine	IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5491-5493	294	AGT	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				AGC	Isoleucine				IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH3	TAT	Tyrosine	IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS3	5509-5511	300	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				TAT	Tyrosine				IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH3	CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS3	5330-5332	307	CTA	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
CH3				CTG	Leucine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

IS98				CCA	Proline			
CH3	NS3	5566-5568	319	CCG	Proline	S	OUI	OUI
IS98				CCA	Proline			
CH3	NS3	5569-5571	320	CCG	Proline	S	OUI	OUI
IS98				ACT	Thréonine			
CH3	NS3	5575-5577	322	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				CCA	Proline			
CH3	NS3	5605-5607	332	CCC	Proline	S	OUI	OUI
IS98				TCC	Sérine			
CH3	NS3	5611-5613	334	TCT	Sérine	S	OUI	OUI
IS98				CGA	Arginine			
CH3	NS3	5638-5640	343	CGG	Arginine	S	OUI	OUI
IS98				GCT	Alanine			
CH3	NS3	5641-5643	344	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				ACC	Thréonine			
CH3	NS3	5677-5679	356	ATC	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				GTC	Valine			
CH3	NS3	5707-5709	366	GTG	Valine	S	OUI	OUI
IS98				AAG	Lysine			
CH3	NS3	5710-5712	367	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
IS98				TGC	Cystéine			
CH3	NS3	5734-5736	375	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI
IS98				GCT	Alanine			
CH3	NS3	5746-5748	379	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				TAC	Tyrosine			
CH3	NS3	5782-5784	391	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI
IS98				ATT	Isoleucine			
CH3	NS3	5881-5883	424	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI
IS98				CGG	Arginine			
CH3	NS3	5890-5892	427	AGG	Arginine	S	OUI	OUI
IS98				AAG	Lysine			
CH3	NS3	5893-5895	428	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
IS98				AGT	Sérine			
CH3	NS3	5896-5898	429	AGC	Sérine	S	OUI	OUI
IS98				AAA	Lysine			
CH3	NS3	5902-5904	431	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
IS98				ACA	Thréonine			
CH3	NS3	5962-5964	451	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				CGT	Arginine			
CH3	NS3	5992-5994	461	CGC	Arginine	S	OUI	OUI
IS98				GGT	Glycine			
CH3	NS3	5998-6000	463	GGC	Glycine	S	OUI	OUI
IS98				GGG	Glycine			
CH3	NS3	6037-6039	467	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
IS98				CCG	Proline			
CH3	NS3	6097-6099	496	CTG	Leucine	NS	OUI	OUI
IS98				TTC	Phénylalanine			
CH3	NS3	6136-6138	509	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				TAT	Tyrosine			
CH3	NS3	6163-6165	518	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI
IS98				GAG	Acide glutamique			
CH3	NS3	6172-6174	521	GAT	Acide aspartique	NS	OUI	OUI
IS98				ITT	Phénylalanine			
CH3	NS3	6211-6213	534	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				CTG	Leucine			
CH3	NS3	6220-6222	537	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				GTT	Valine			
CH3	NS3	6262-6264	551	GTG	Valine	S	OUI	OUI
IS98				GAC	Acide aspartique			
CH3	NS3	6289-6291	560	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI
IS98				TGC	Cystéine			
CH3	NS3	6301-6303	564	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI
IS98				GAT	Acide aspartique			
CH3	NS3	6307-6309	566	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI
IS98				GGT	Glycine			
CH3	NS3	6310-6312	567	GGC	Glycine	S	OUI	OUI
IS98				ACA	Thréonine			
CH3	NS3	6325-6327	572	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				CCG	Proline			
CH3	NS3	6391-6393	594	CCC	Proline	S	OUI	OUI
IS98				ITC	Phénylalanine			
CH3	NS3	6451-6453	614	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				GCC	Alanine			
CH3	NS3	6454-6456	615	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				AAA	Lysine			
CH3	NS3	6463-6465	618	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
IS98				GTT	Valine			
CH3	NS4A	6490-6492	8	GTC	Valine	S	OUI	OUI
IS98				GAG	Acide glutamique			
CH3	NS4A	6508-6510	14	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI
IS98				CAC	Histidine			
CH3	NS4A	6511-6513	15	CAT	Histidine	S	OUI	OUI
IS98				ACA	Thréonine			
CH3	NS4A	6526-6528	20	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				GCA	Alanine			
CH3	NS4A	6535-6537	23	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				CCA	Proline			
CH3	NS4A	6610-6612	48	CCG	Proline	S	OUI	OUI
IS98				CTT	Leucine			
CH3	NS4A	6619-6621	51	CTC	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				TTG	Leucine			
CH3	NS4A	6646-6648	60	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				ITC	Phénylalanine			
CH3	NS4A	6673-6675	69	ITT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				CTG	Leucine			
CH3	NS4A	6712-6714	82	TTG	Leucine	S	OUI	OUI

IS98				GGC	Glycine			
CH3	NS4A	6718-6720	84	GGT	Glycine	S	OUI	OUI
IS98				GCT	Alanine			
CH3	NS4A	6721-6723	85	ATT	Isoleucine	NS	OUI	OUI
IS98				TTT	Phénylalanine			
CH3	NS4A	6742-6744	92	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				CCA	Proline			
CH3	NS4A	6766-6768	100	TCA	Sérine	NS	OUI	OUI
IS98				TTG	Leucine			
CH3	NS4A	6790-6793	108	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				CTG	Leucine			
CH3	NS4A	6793-6795	109	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				CTC	Leucine			
CH3	NS4A	6796-6798	110	CTT	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				ACA	Thréonine			
CH3	NS4A	6853-6855	129	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				GAG	Acide glutamique			
CH3	NS4B	6919-6921	2	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI
IS98				GAC	Acide aspartique			
CH3	NS4B	6934-6936	7	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI
IS98				AGG	Arginine			
CH3	NS4B	7024-7026	37	AGA	Arginine	S		OUI
IS98				ACA	Thréonine			
CH3	NS4A	7057-7059	48	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				TTG	Leucine			
CH3	NS4A	7090-7092	59	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				ATC	Isoleucine			
CH3	NS4A	7108-7110	65	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
IS98				ACC	Thréonine			
CH3	NS4A	7114-7116	67	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI
IS98				ATA	Isoleucine			
CH3	NS4A	7129-7131	72	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
IS98				AAC	Asparagine			
CH3	NS4A	7132-7134	73	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
IS98				CAG	Glutamine			
CH3	NS4A	7138-7140	75	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
IS98				TCG	Sérine			
CH3	NS4B	7195-7197	94	TCA	Sérine	S	OUI	OUI
IS98				CTC	Leucine			
CH3	NS4B	7201-7203	96	CTT	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				CTG	Leucine			
CH3	NS4B	7204-7206	97	TTG	Leucine	S		OUI
IS98				GCT	Alanine			
CH3	NS4B	7210-7212	99	GCA	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				ACC	Thréonine			
CH3	NS4B	7240-7242	109	ACA	Thréonine	S		OUI
IS98				GTT	Valine			
CH3	NS4A	7243-7245	110	GTG	Valine	S	OUI	OUI
IS98				GTA	Valine			
CH3	NS4A	7249-7251	112	GTG	Valine	S	OUI	OUI
IS98				CTC	Leucine			
CH3	NS4A	7264-7266	117	CTT	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				CTT	Leucine			
CH3	NS4A	7267-7269	118	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
IS98				TTT	Phénylalanine			
CH3	NS4A	7270-7272	119	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
IS98				CCC	Proline			
CH3	NS4A	7294-7296	127	CCA	Proline	S	OUI	OUI
IS98				GGT	Glycine			
CH3	NS4A	7297-7299	128	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
IS98				CAA	Glutamine			
CH3	NS4B	7303-7305	130	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI
IS98				GCT	Alanine			
CH3	NS4B	7306-7308	131	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				GCC	Alanine			
CH3	NS4B	7342-7344	143	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				CAG	Glutamine			
CH3	NS4B	7438-7440	175	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
IS98				GTA	Valine			
CH3	NS4B	7498-7500	195	GTG	Valine	S	OUI	OUI
IS98				GCC	Alanine			
CH3	NS4B	7507-7509	198	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				GCC	Alanine			
CH3	NS4B	7525-7527	204	GCA	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				GCA	Alanine			
CH3	NS4B	7555-7557	214	GCG	Alanine	S	OUI	OUI
IS98				TCA	Sérine			
CH3	NS5	7840-7842	54	CCA	Proline	NS	NON	OUI

1.2.4. Annexe 10 : Séquence chimérique IS98-NS2A/NS2B vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08
IS98	NS2A	3526-3528	1	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH4				TAC	Tyrosine			
IS98	NS2A	3529-3531	2	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH4				AAC	Asparagine			
IS98	NS2A	3544-3546	7	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI
CH4				GAT	Acide aspartique			
IS98	NS2A	3556-3558	11	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				CTG	Leucine			
IS98	NS2A	3610-3612	29	ACA	Thréonine	S	OUI	OUI
CH4				ACG	Thréonine			
IS98	NS2A	3673-3675	50	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI
CH4				ACC	Thréonine			
IS98	NS2A	3688-3690	55	TTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTG	Leucine			
IS98	NS2A	3709-3711	62	GGG	Glycine	S	OUI	OUI
CH4				GGA	Glycine			
IS98	NS2A	3733-3735	70	TCG	Sérine	S	OUI	OUI
CH4				TCA	Sérine			
IS98	NS2A	3772-3774	83	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH4				TTT	Phénylalanine			
IS98	NS2A	3778-3780	85	ATA	Isoleucine	NS	OUI	OUI
CH4				GTA	Valine			
IS98	NS2A	3781-3783	86	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
CH4				CAG	Glutamine			
IS98	NS2A	3838-3840	105	ATT	Isoleucine	NS	OUI	OUI
CH4				ACC	Thréonine			
IS98	NS2A	3862-3864	113	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH4				TTT	Phénylalanine			
IS98	NS2A	3865-3867	114	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH4				TTC	Phénylalanine			
IS98	NS2A	3877-3879	118	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH4				TAC	Tyrosine			
IS98	NS2A	3934-3936	137	GCG	Alanine	S	OUI	OUI
CH4				GCA	Alanine			
IS98	NS2A	3953-3954	143	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTG	Leucine			
IS98	NS2A	3982-3984	153	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH4				AAC	Asparagine			
IS98	NS2A	3988-3990	155	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH4				GTT	Valine			
IS98	NS2A	3991-3993	156	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH4				GTT	Valine			
IS98	NS2A	3997-3999	158	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTG	Leucine			
IS98	NS2A	4000-4002	159	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				CTG	Leucine			
IS98	NS2A	4018-4020	165	CGG	Arginine	NS	OUI	OUI
CH4				GGG	Glycine			
IS98	NS2A	4030-4032	169	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				CTG	Leucine			
IS98	NS2A	4036-3038	171	CTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTG	Leucine			
IS98	NS2A	4051-4053	176	ATA	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH4				ATT	Isoleucine			
IS98	NS2A	4078-4080	185	AGC	Sérine	S	OUI	OUI
CH4				AGT	Sérine			
IS98	NS2A	4096-4098	191	AGG	Arginine	S	OUI	OUI
CH4				AGA	Arginine			
IS98	NS2A	4111-4113	196	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
CH4				AAG	Lysine			
IS98	NS2A	4132-4134	203	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTA	Leucine			
IS98	NS2A	4180-4182	219	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH4				GCC	Alanine			
IS98	NS2A	4210-4212	229	CGT	Arginine	S	OUI	OUI
CH4				CGC	Arginine			
IS98	NS2B	4219-4221	1	GGA	Acide glutamique	NS	OUI	OUI
CH4				GGG	Glycine			
IS98	NS2B	4243-4245	9	ACA	Thréonine	S	OUI	OUI
CH4				ACT	Thréonine			
IS98	NS2B	4255-4257	13	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH4				TTG	Leucine			
IS98	NS2B	4285-4287	23	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH4				GAA	Acide glutamique			
IS98	NS2B	4300-4302	28	TCC	Sérine	S	OUI	OUI
CH4				TCT	Sérine			
IS98	NS2B	4378-4380	54	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH4				ATC	Isoleucine			
IS98	NS2B	4384-4386	56	AGA	Arginine	S	OUI	OUI
CH4				AGG	Arginine			
IS98	NS2B	4396-4398	60	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH4				ATC	Isoleucine			
IS98	NS2B	4420-4422	68	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH4				ATC	Isoleucine			
IS98	NS2B	4432-4434	72	AGC	Sérine	S	OUI	OUI
CH4				AGT	Sérine			
IS98	NS2B	4447-4449	77	GTT	Valine	S	OUI	OUI
CH4				GTG	Valine			
IS98	NS2B	4462-4464	82	GGT	Glycine	S	OUI	OUI
CH4				GAT	Acide aspartique			
IS98	NS2B	4465-4467	83	GAA	Acide glutamique	NS	OUI	OUI
CH4				GGG	Glycine			
IS98	NS2B	4504-4506	96	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
CH4				AAA	Lysine			

IS98	NS2B	4558-4560	114	GCA	Alanine	S	OUI	OUI
CH4				GCG	Alanine			
IS98	NS3	5359-5361	250	AGA	Arginine	NS	NON	NON
CH4				AAA	Lysine			
IS98	NS5	7840-7842	54	TCA	Sérine	NS	NON	OUI
CH4				CCA	Proline			
IS98	NS5	7912-7914	78	ATT	Isoleucine	S	NON	OUI
CH4				ATA	Isoleucine			
IS98	NS5	8353-8355	225	GCT	Alanine	S	NON	NON
CH4				GCC	Alanine			
IS98	NS5	10042-10044	788	GTC	Valine	NS	NON	NON
CH4				ATC	Isoleucine			

1.2.5. Annexe 11 : Séquence chimérique IS98-NS1 vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	C	340-342	82	CTG	Leucine	S	NON	NON																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CTT	Leucine				IS98	E	2437-2439	491	GTT	Valine	S	OUI	OUI	CH5	GTC	Valine	IS98	NS1	2482-2484	5	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2518-2520	17	AAG	Lysine	NS	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	2524-2526	19	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH5	GTC	Valine	IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGA	Arginine	IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine
IS98	E	2437-2439	491	GTT	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GTC	Valine				IS98	NS1	2482-2484	5	GCC	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2518-2520	17	AAG	Lysine	NS	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	2524-2526	19	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH5	GTC	Valine	IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGA	Arginine	IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine						
IS98	NS1	2482-2484	5	GCC	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCT	Alanine				IS98	NS1	2518-2520	17	AAG	Lysine	NS	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	2524-2526	19	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH5	GTC	Valine	IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGA	Arginine	IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																		
IS98	NS1	2518-2520	17	AAG	Lysine	NS	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AGT	Sérine				IS98	NS1	2524-2526	19	GTG	Valine	S	OUI	OUI	CH5	GTC	Valine	IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGA	Arginine	IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																														
IS98	NS1	2524-2526	19	GTG	Valine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GTC	Valine				IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGA	Arginine	IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																										
IS98	NS1	2560-2562	31	CGG	Arginine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CGA	Arginine				IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI	CH5	TAC	Tyrosine	IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																						
IS98	NS1	2569-2571	34	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TAC	Tyrosine				IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAA	Glutamine	IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																		
IS98	NS1	2608-2610	47	CAG	Glutamine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CAA	Glutamine				IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																														
IS98	NS1	2614-2616	49	GCT	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCC	Alanine				IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGG	Arginine	IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																										
IS98	NS1	2641-2643	58	CGA	Arginine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CGG	Arginine				IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	TCA	Sérine	IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																						
IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TCA	Sérine				IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																		
IS98	NS1	2707-2709	80	AAG	Lysine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AAA	Lysine				IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	TCG	Sérine	IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																														
IS98	NS1	2764-2766	99	TCA	Sérine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TCG	Sérine				IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCT	Alanine	IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																										
IS98	NS1	2767-2769	100	GCA	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCT	Alanine				IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI	CH5	CGT	Arginine	IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																						
IS98	NS1	2776-2778	103	CGC	Arginine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CGT	Arginine				IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGC	Sérine	IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	2830-2832	121	AGT	Sérine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AGC	Sérine				IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	2833-2835	122	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				ATC	Isoleucine				IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTA	Leucine	IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	2836-2838	123	TTA	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CTA	Leucine				IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTT	Leucine	IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	2851-2853	128	CTC	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CTT	Leucine				IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	2896-2898	143	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TGC	Cystéine				IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI	CH5	CCA	Proline	IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	2899-2901	144	CCG	Proline	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CCA	Proline				IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	2926-2928	153	TTA	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TTG	Leucine				IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATC	Isoleucine	IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	3019-3021	184	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				ATC	Isoleucine				IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCC	Alanine	IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	3028-3030	187	GCT	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCC	Alanine				IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI	CH5	AAA	Lysine	IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3034-3036	189	AAG	Lysine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AAA	Lysine				IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI	CH5	GCG	Alanine	IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	3112-3114	215	GCA	Alanine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCG	Alanine				IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI	CH5	TGC	Cystéine	IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	3136-3138	223	TGT	Cystéine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TGC	Cystéine				IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI	CH5	CAC	Histidine	IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	3154-3156	229	CAT	Histidine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CAC	Histidine				IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTC	Leucine	IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3178-3180	237	CTT	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CTC	Leucine				IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	CTG	Leucine	IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	3190-3192	241	TTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CTG	Leucine				IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI	CH5	AAC	Asparagine	IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	3226-3228	253	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AAC	Asparagine				IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGT	Glycine	IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	3280-3282	271	GGC	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GGT	Glycine				IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI	CH5	GAT	Acide aspartique	IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3295-3297	276	GAC	Acide aspartique	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GAT	Acide aspartique				IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGG	Glycine	IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	3313-3315	282	GGA	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GGG	Glycine				IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACC	Thréonine	IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	3316-3318	283	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				ACC	Thréonine				IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI	CH5	AGT	Sérine	IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	3412-3414	315	AGC	Sérine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				AGT	Sérine				IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI	CH5	TTG	Leucine	IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3430-3432	321	CTG	Leucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				TTG	Leucine				IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI	CH5	CAG	Glutamine	IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS1	3439-3441	324	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				CAG	Glutamine				IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI	CH5	ACG	Thréonine	IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
IS98	NS1	3442-3444	325	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				ACG	Thréonine				IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI	CH5	GGC	Glycine	IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
IS98	NS1	3463-3465	332	GGT	Glycine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GGC	Glycine				IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI	CH5	ATT	Isoleucine	IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
IS98	NS1	3472-3474	335	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				ATT	Isoleucine				IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON	CH5	GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
IS98	NS3	5308-5310	233	GCT	Alanine	S	NON	NON																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CH5				GCC	Alanine																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

1.2.6. Annexe 12 : Séquence chimérique IS98-5'UTR/C/prM/E vs séquence parentale Israël 1998

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)	Attendue (OUI/NON)	Mutation présente sur IT08
IS98	C	193-195	33	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCA	Alanine			
IS98	C	232-234	46	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTC	Phénylalanine			
IS98	C	280-282	62	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI
CH6				ACT	Thréonine			
IS98	C	313-315	73	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAC	Asparagine			
IS98	C	352-354	86	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
CH6				AAA	Lysine			
IS98	C	379-381	95	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATT	Isoleucine			
IS98	prM	481-483	6	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTT	Phénylalanine			
IS98	prM	490-492	9	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
CH6				AAA	Lysine			
IS98	prM	493-495	10	GTG	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTT	Valine			
IS98	prM	559-561	32	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAT	Asparagine			
IS98	prM	598-600	45	TGC	Cystéine	S	OUI	OUI
CH6				TGT	Cystéine			
IS98	prM	604-606	47	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI
CH6				GAC	Acide aspartique			
IS98	prM	637-639	58	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCC	Alanine			
IS98	prM	727-729	88	AGA	Arginine	S	OUI	OUI
CH6				AGG	Arginine			
IS98	prM	784-786	107	AAG	Lysine	S	OUI	OUI
CH6				AAA	Lysine			
IS98	prM	826-828	121	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				CTG	Leucine			
IS98	prM	850-852	129	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				CTG	Leucine			
IS98	prM	856-858	131	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAT	Asparagine			
IS98	prM	868-870	135	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCT	Alanine			
IS98	prM	880-882	139	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCT	Alanine			
IS98	prM	901-903	146	GGG	Glycine	S	OUI	OUI
CH6				GGA	Glycine			
IS98	prM	919-921	152	AGA	Arginine	S	OUI	OUI
CH6				CGA	Arginine			
IS98	prM	937-939	158	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				TTA	Leucine			
IS98	prM	943-945	160	CTT	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				CTC	Leucine			
IS98	prM	952-954	163	GCC	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCT	Alanine			
IS98	prM	958-960	165	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCC	Alanine			
IS98	E	967-969	1	TTT	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTC	Phénylalanine			
IS98	E	1000-1002	12	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				CTG	Leucine			
IS98	E	1003-1005	13	GAA	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH6				GAG	Acide glutamique			
IS98	E	1009-1011	15	GTG	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTA	Valine			
IS98	E	1012-1014	16	TCT	Sérine	S	OUI	OUI
CH6				TCC	Sérine			
IS98	E	1069-1071	35	TCT	Sérine	S	OUI	OUI
CH6				TCC	Sérine			
IS98	E	1081-1083	39	CCT	Proline	S	OUI	OUI
CH6				CCC	Proline			
IS98	E	1087-1089	41	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATT	Isoleucine			
IS98	E	1114-1116	50	GCG	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GCT	Alanine			
IS98	E	1183-1185	73	GCG	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCA	Alanine			
IS98	E	1210-1212	82	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAC	Asparagine			
IS98	E	1285-1287	107	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				TTA	Leucine			
IS98	E	1330-1332	122	TCT	Sérine	S	OUI	OUI
CH6				TCC	Sérine			
IS98	E	1342-1344	126	ATA	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ACA	Thréonine			
IS98	E	1366-1368	134	AAT	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAC	Asparagine			
IS98	E	1375-1377	137	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH6				TAT	Tyrosine			
IS98	E	1387-1389	141	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATC	Isoleucine			
IS98	E	1405-1407	147	ACT	Thréonine	S	OUI	OUI
CH6				ACC	Thréonine			
IS98	E	1420-1422	152	CAC	Histidine	S	OUI	OUI
CH6				CAT	Histidine			
IS98	E	1441-1443	159	GTT	Valine	NS	OUI	OUI
CH6				ATT	Isoleucine			
IS98	E	1444-1446	160	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
CH6				GGG	Glycine			
IS98	E	1519-1521	185	GAG	Acide glutamique	S	OUI	OUI
CH6				GAA	Acide glutamique			

IS98	E	1564-1566	200	GCA	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCC	Alanine			
IS98	E	1567-1569	201	TAC	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH6				TAT	Tyrosine			
IS98	E	1597-1599	211	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTT	Phénylalanine			
IS98	E	1645-1647	227	AGT	Sérine	S	OUI	OUI
CH6				AGC	Sérine			
IS98	E	1708-1710	248	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
CH6				ACA	Thréonine			
IS98	E	1774-1776	270	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATC	Isoleucine			
IS98	E	1801-1803	279	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTT	Valine			
IS98	E	1870-1872	302	TAT	Tyrosine	S	OUI	OUI
CH6				TAC	Tyrosine			
IS98	E	1888-1890	308	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCA	Alanine			
IS98	E	1981-1983	339	CCT	Proline	S	OUI	OUI
CH6				CCC	Proline			
IS98	E	1984-1986	340	ATC	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATT	Isoleucine			
IS98	E	1999-2001	345	TCA	Sérine	S	OUI	OUI
CH6				TCC	Sérine			
IS98	E	2014-2016	350	ACG	Thréonine	S	OUI	OUI
CH6				ACA	Thréonine			
IS98	E	2017-2019	351	CCA	Proline	S	OUI	OUI
CH6				CCG	Proline			
IS98	E	2038-2040	358	GTC	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTT	Valine			
IS98	E	2068-2070	368	AAC	Asparagine	S	OUI	OUI
CH6				AAT	Asparagine			
IS98	E	2071-2073	369	GCT	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCC	Alanine			
IS98	E	2098-2100	378	CCC	Proline	S	OUI	OUI
CH6				CCT	Proline			
IS98	E	2122-2124	386	GTG	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTA	Valine			
IS98	E	2125-2127	387	GGC	Glycine	S	OUI	OUI
CH6				GGT	Glycine			
IS98	E	2143-2145	393	ATT	Isoleucine	S	OUI	OUI
CH6				ATC	Isoleucine			
IS98	E	2158-2160	398	CAC	Histidine	S	OUI	OUI
CH6				CAT	Histidine			
IS98	E	2197-2199	411	ACC	Thréonine	S	OUI	OUI
CH6				ACT	Thréonine			
IS98	E	2203-2205	413	AAA	Lysine	S	OUI	OUI
CH6				AAG	Lysine			
IS98	E	2206-2208	414	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
CH6				GGG	Glycine			
IS98	E	2218-2220	418	CTA	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				TTA	Leucine			
IS98	E	2278-2280	438	GTT	Valine	S	OUI	OUI
CH6				GTA	Valine			
IS98	E	2305-2307	447	GGA	Glycine	S	OUI	OUI
CH6				GGT	Glycine			
IS98	E	2311-2313	449	GCA	Alanine	S	OUI	OUI
CH6				GCG	Alanine			
IS98	E	2314-2316	450	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTT	Phénylalanine			
IS98	E	2326-2328	454	TTC	Phénylalanine	S	OUI	OUI
CH6				TTT	Phénylalanine			
IS98	E	2350-2352	462	CAA	Glutamine	S	OUI	OUI
CH6				CAG	Glutamine			
IS98	E	2356-2358	464	TTG	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				TTA	Leucine			
IS98	E	2368-2370	468	CTC	Leucine	S	OUI	OUI
CH6				CTT	Leucine			
IS98	E	2398-2400	478	GAT	Acide aspartique	S	OUI	OUI
CH6				GAC	Acide aspartique			
IS98	NS1	2746-2748	93	CAG	Glutamine	S	NON	NON
CH6				CAA	Glutamine			
IS98	NS5	8971-8973	431	CCA	Proline	NS	NON	NON
CH6				CAA	Glutamine			
IS98	NS5	8974-8976	432	AAA	Lysine	NS	NON	NON
CH6				ATT	Isoleucine			

1.2.7. Annexe 13 : Liste des mutations présentes sur le Clone Infectieux Israël 1998 (CI-IS-98)

Le clone infectieux CI-IS-98 a été utilisé afin de générer les amplicons Israël 1998, permettant la construction des chimères virales. Ces mutations font donc partie intégrante des génomes chimériques (pour leur partie Israël 1998). Toutefois, aucune différence significative entre la virulence du clone infectieux CI-IS-98 et la souche parentale Israël 1998 n'a été démontrée (ref Bahuon).

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé	Synonyme (S)/non-synonyme (NS)
IS98	NS1	2518-2520	17	AAT	Asparagine	NS
CI-IS-98				AGT	Sérine	
IS98	NS1	2800-2802	111	TTG	Leucine	S
CI-IS-98				CTG	Leucine	
IS98	NS2A	3982-3984	153	AAT	Asparagine	S
CI-IS-98				AAC	Asparagine	
IS98	NS2A	3988-3990	155	GTC	Valine	S
CI-IS-98				GTT	Valine	
IS98	NS2A	3991-3993	156	GTC	Valine	S
CI-IS-98				GTT	Valine	
IS98	NS2A	4018-4020	165	CGG	Arginine	NS
CI-IS-98				GGG	Glycine	
IS98	NS2B	4447-4449	77	GTT	Valine	S
CI-IS-98				GTG	Valine	
IS98	NS2B	4462-4464	82	GGT	Glycine	NS
CI-IS-98				GAT	Acide aspartique	
IS98	NS2B	4465-4467	83	GAA	Acide glutamique	NS
CI-IS-98				GGA	Glycine	
IS98	NS3	6097-6099	496	CCG	Proline	NS
CI-IS-98				CTG	Leucine	
IS98	NS3	6172-6174	521	GAG	Acide glutamique	NS
CI-IS-98				GAT	Acide aspartique	
IS98	NS4B	6934-6936	7	GAC	Acide aspartique	S
CI-IS-98				GAT	Acide aspartique	
IS98	NS4B	7354-7356	147	AAA	Lysine	S
CI-IS-98				AAG	Lysine	
IS98	NS5	8464-8466	262	AGC	Sérine	S
CI-IS-98				AGT	Sérine	
IS98	NS5	8518-8520	280	AAC	Asparagine	NS
CI-IS-98				AAG	Lysine	

1.2.8. Annexe 14 : Liste des mutations non-synonymes présentes entre les souches parentales West Nile Israël 1998 et West Nile Italie 2008

	Protéine d'intérêt	Position en nt sur le génome total	Position en aa sur la protéine d'intérêt	Séquence codon (NNN)	Acide aminé codé
IS98	E	1342-1344	126	ATA	I
IT08				ACA	T
IS98	E	1441-1443	159	GTT	V
IT08				ATT	I
IS98	NS1	2518-2520	17	AAT	N
IT08				AGT	S
IS98	NS1	2677-2679	70	GCA	A
IT08				TCA	S
IS98	NS2A	3778-3780	85	ATA	I
IT08				GTA	V
IS98	NS2A	3838-3840	105	ATT	I
IT08				ACC	T
IS98	NS2A	4018-4029	165	CGG	R
IT08				GGG	G
IS98	NS2B	4462-4464	82	GGT	G
IT08				GAT	D
IS98	NS2B	4465-4467	83	GAA	E
IT08				GGA	G
IS98	NS2B	4525-4527	103	GTC	V
IT08				GCC	A
IS98	NS3	5677-5679	356	ACC	T
IT08				ATC	I
IS98	NS3	6097-6099	496	CCG	P
IT08				CTG	L
IS98	NS3	6172-6174	521	GAG	E
IT08				GAT	D
IS98	NS4A	6721-6723	85	GCT	A
IT08				ATT	I
IS98	NS4A	6766-6768	100	CCA	P
IT08				TCA	S
IS98	NS4B	7660-6762	249	GAA	E
IT08				GAC	D
IS98	NS5	7837-7839	53	CAT	H
IT08				TAT	Y
IS98	NS5	7840-7842	54	TCA	S
IT08				CCA	P
IS98	NS5	8452-8454	258	GTA	V
IT08				GCA	A
IS98	NS5	8518-8520	280	AAC	N
IT08				AAG	K
IS98	NS5	8794-8796	372	GCG	A
IT08				GTG	V
IS98	NS5	8944-8946	422	AGG	R
IT08				AAG	K

1.3. Annexe 15 : Évaluation in vivo de la virulence des chimères : modèle murin BALB/cByJ

Le suivi des signes clinique des souris a été effectué bi-quotidiennement dès l'apparition des premiers signes cliniques (poil ébouriffé, signes neurologiques...). L'ensemble des expérimentations ont été réalisées dans une animalerie BSL-3, à l'ANSES de Maisons-Alfort.



Photo des isobox ventilées dans lesquelles les souris BALB/cByJ saines et infectées par la chimère, ou par les virus parentaux ont été stockées, dans des cages de 5 individus, durant toute la durée de l'expérimentation. Animalerie BSL-3, ANSES, Maisons-Alfort.



Photo d'une souris BALB/cByJ présentant un poil ébouriffé (signe clinique de l'infection, souche parentale Israël 1998, 10ème jour post-infection, 10 PFU/mL).

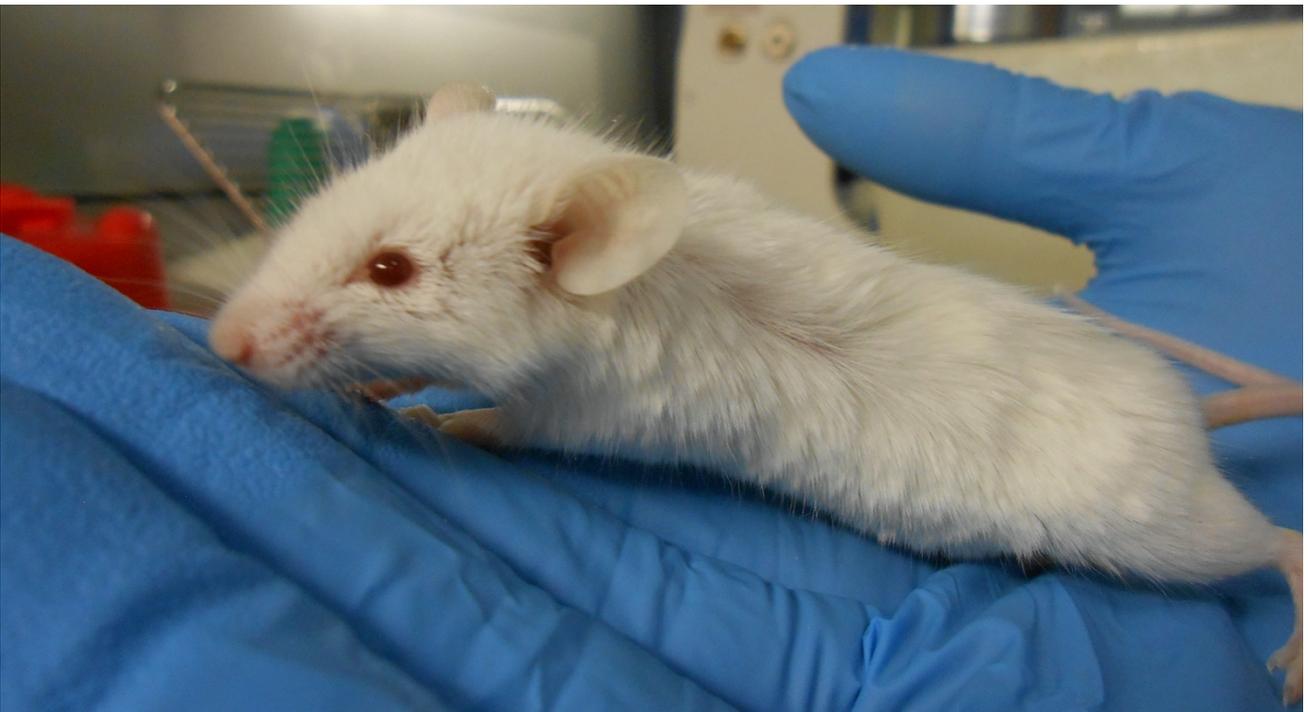


Photo d'une souris BALB/cByJ présentant un poil ébouriffé (signe clinique de l'infection, souche parentale Italie 2008, 10ème jour post-infection, 10 PFU/mL).

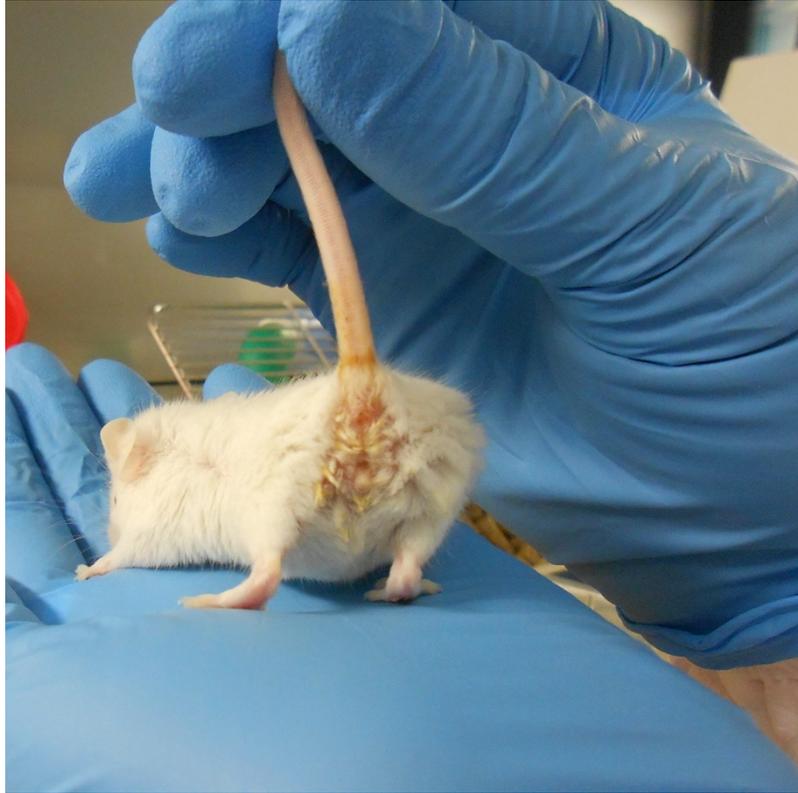


Photo d'une souris BALB/cByJ présentant des troubles intestinaux (diarrhée, signe clinique de l'infection, souche parentale Italie 2008, 10ème jour post-infection, 10 PFU/mL).

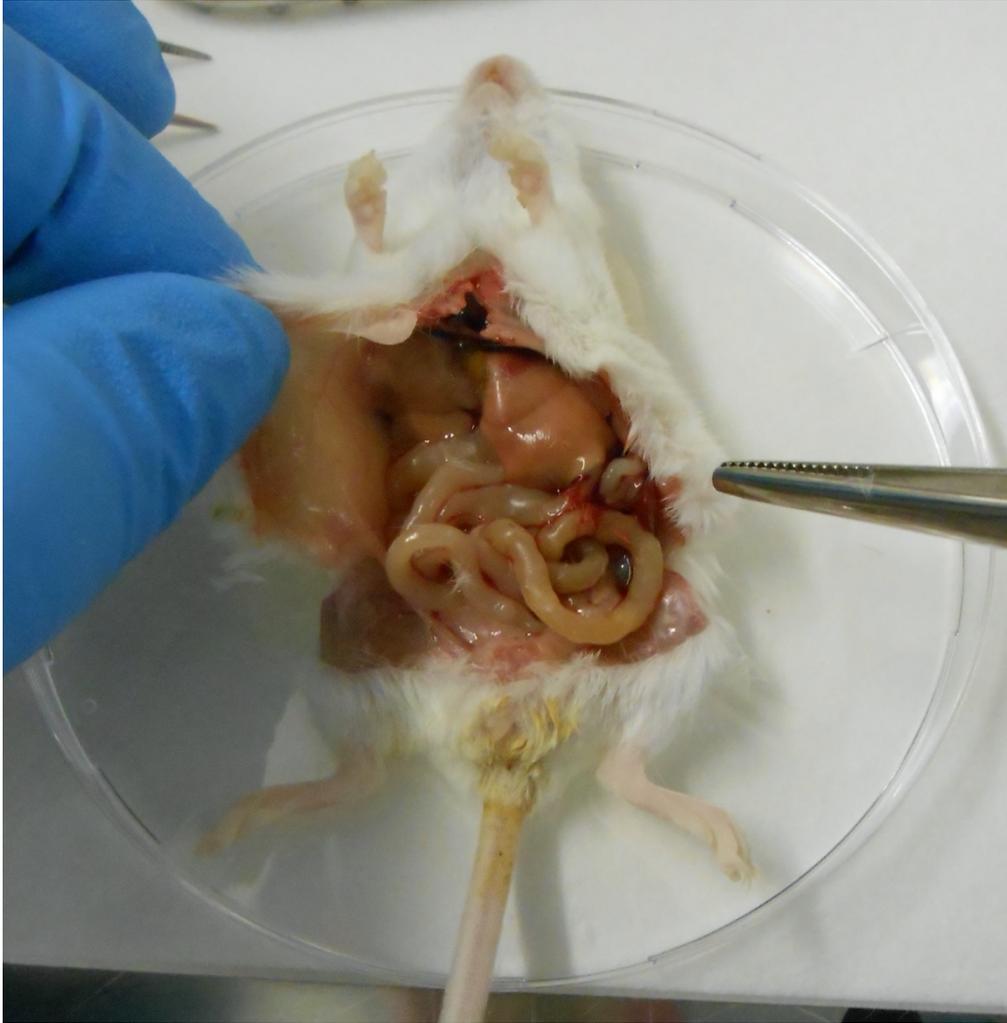


Photo de la dissection d'une souris BALB/cByJ présentant des troubles intestinaux (diarrhée, signe clinique de l'infection, souche parentale Italie 2008, 10ème jour post-infection, 10 PFU/mL). On remarque une forte décoloration du foie.



Photo du foie d'une souris BALB/cByJ saine, au dernier jour de l'expérimentation. On remarque que contrairement au foie d'une souris infectée, le foie sain reste très rosé, signe de bonne santé de l'animal.

1.4. Annexe 16 : Clé d'identification des moustiques de Guadeloupe

CLE D'IDENTIFICATION DES MOUSTIQUES ADULTES FEMELLES DE GUADELOUPE

Avertissements :

Cette clé a été établie à partir des documents suivants :

- The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics, with key to adult females and larvae (Stephanie Clark-Gil and Richard F. Darsie Jr ; Mosquito systematics, 15(3), 1983).
- Les moustiques de Guadeloupe (Francis SCHAFFNER, Parc National de Guadeloupe, EID Méditerranée, 2003).
- Lutte Anti-Vectorielle en santé internationale (OMS, 1973).

Liste des espèces figurant dans la clef :

- *Anopheles albimanus*
- *Anopheles aquasalis*
- *Anopheles argyritarsis*
- *Aedes aegypti*
- *Culex atratus*
- *Culex bisculatus*
- *Culex bahamensis*
- *Culex chidesteri*
- *Culex corniger*
- *Culex declarator*
- *Culex elevator*
- *Culex habilitator*
- *Culex inflicus*
- *Culex nigripalpus*
- *Culex Quinquefasciatus*
- *Culex secutor*
- *Deinocerites magnus*
- *Limatus durahamii*
- *Mansonia titillans*
- *Ochlerotatus busckii*
- *Ochlerotatus condolegens*
- *Ochlerotatus serratus*
- *Ochlerotatus taeniorhynchus*
- *Ochlerotatus tortilis*
- *Psorophora cingulata*
- *Psorophora confinis*
- *Psorophora ferox*
- *Psorophora insularia*
- *Toxorhynchites guadeloupensis*
- *Uranoteania apicalis*
- *Wyeomyia grayii*

Auteurs :

Joël GUSTAVE et Cédric RAMDINI, ARS Guadeloupe

Nonito PAGES, CIRAD Guadeloupe

Francis SCHAFFNER

1-Proboscis fortement recourbé vers le bas et plus long que les palpes, imagos de grande taille ornés d'écailles à reflets métalliques vert.....	<i>Toxorhynchites guadeloupensis</i>
1-Proboscis droit	2
2(1)-Palpes labiaux aussi longs que le labium, scutellum non trilobé, thorax allongé et étroit, abdomen dépourvu d'écailles	3
2(1)-Palpes labiaux plus courts que le labium, scutellum trilobé, abdomen couvert d'écailles.....	5
3(2)- Cinquième tarsomère P3 entièrement blanc ; dernier article palpes sombre , étroits anneaux blancs sur les articulations	<i>Anopheles argyritarsis</i>
3(2)-Cinquième tarsomère P3 avec anneau basal noir, palpes avec segment terminal blanc	4
4(3)-Avant derniers segments des palpes avec nombreuses écailles blanches..	<i>Anopheles aquasalis</i>
4(3)-Avant derniers segments des palpes avec quelques écailles blanches	<i>Anopheles albimanus</i>
5(2)-Thorax avec écailles bleues, proboscis plus ou moins renflé.....	6
5(2)-Thorax sans écailles bleues, proboscis non renflé	7
6(5)-Premier tergite abdominal avec écailles jaunâtres, autres tergites et pattes sombres, proboscis élargi en moitié distale	<i>Limatus durhamii</i>
6(5)-Insecte de petite taille (< 3 mm), tergites abdominaux sombres avec bandes apicales claires ; tarsomères P3 avec anneaux clairs, proboscis plus ou moins renflé à l'apex, cellule R₂ toujours plus courte que veine R₂₊₃	<i>Uranotearia apicalis</i>
7(5)-Mésopostnotum avec plusieurs longues soies, deux fortes soies sur vertex Occiput sans ligne de soie érigées, avec seulement des écailles larges couchées ; abdomen avec écailles sombres dorsales et écailles claires ventrales séparées par une ligne droite	<i>Wyeomyia grayii</i>
Occiput avec une ligne de soies érigées ; abdomen avec écailles sombres dorsales et écailles claires ventrales séparées par une ligne irrégulière	<i>Isostomyia perturbans</i>
7(5)-Mésopostnotum sans longues soies (parfois présence de deux petites)	8
8(7)-Présence de soies postspiraculaires, abdomen effilé.....	9
8(7)-Absence de soies postspiraculaires,	18
9(8)-Présence d'écailles blanches en forme de lyre sur le thorax, anneaux blancs sur les tarsi	<i>Aedes aegypti</i>
9(8)-Absence d'écailles blanches en forme de lyre sur le thorax	10
10(9)-Absence de soies préspiraculaires	11
10(9)-Présence de soies préspiraculaires	15
11(10)-Présence d'anneaux clairs sur tarsi P3.....	12
11(10)-Tarsi sans anneaux clairs	13

- 12(11)-Anneau blanc médian sur le proboscis, étroites bandes basales claires sur les tergites abdominaux **Ochlerotatus taeniorhynchus**
- 12(11)-Proboscis entièrement sombre, présence de 5 lignes d'écailles dorées sur le mésonotum **Ochlerotatus busckii**
- 13(11)-Absence de bandes basales claires sur les tergites abdominaux (seulement taches latérobasales), scutum brun avec parfois bande médiane d'écailles jaunâtres **Ochlerotatus serratus**
- 13(11)-Présence de bandes basales claires sur les tergites abdominaux **14**
- 14(13)- Thorax sombre avec une large bande claire d'écailles dorées sur le scutum, présence d'écailles dorées (jaunes ?) sur l'occiput **Ochlerotatus condolescens**
- 14(13)-Thorax uniformément sombre **Ochlerotatus tortilis**
- 15(10)-Proboscis comportant une partie claire **16**
- 15(10)-Proboscis uniformément noir **17**
- 16(15)-Proboscis avec étroit anneau blanc sur le tiers distal, tarsi sombres ornés d'étroits anneaux blancs basaux, tergites abdominaux sombres avec taches d'écailles claires apicales et latérales **Psorophora cingulata**
- 16(15)-Proboscis clair en partie médiane, tarsi P3 ornés d'étroits anneaux clairs basaux, tergites abdominaux II et III avec bande d'écailles apicales claires triangulaires **Psorophora confinis**
- 17(15)-Tarsi avec anneaux clairs basaux ; tergites abdominaux avec bandes apicales d'écailles claires **Psorophora insularia**
- 17(15)-Segments 4 et 5 des tarsi P3 couverts d'écailles claires ; tergites abdominaux sombres avec taches apicolatérales d'écailles claires **Psorophora ferox**
- 18(8)-Imago d'aspect général sombre, proboscis saupoudré d'écailles claires et orné d'un anneau clair étroit près du tiers apical, abdomen tronqué, tergites sombres avec quelques écailles claires, fortes touffes d'épines sur segment VIII, bandes claires sur les tarsi, griffes des tarsi visibles **Mansonia titillans**
- 18(8)-Imago d'aspect général brun ou marron, griffes des tarsi petites et peu visibles, présence de pulvilles **19**
- 19(18)-Abdomen légèrement effilé, antenne beaucoup plus longue que le proboscis, tergites abdominaux et tarsi sombres **Deinocerites magnus**
- 19(18)-Abdomen tronqué, antenne à peu près de la même longueur que le proboscis **20**
- 20(19) Palpes longueur 0.35 de la trompe (sg Micraedes) **Culex bisculatus**
 Palpes longueur inférieur à 0.25 de la trompe **21**
- 21(20) Présence majoritaire d'écailles allongées sur les veines alaires R2-R3 (sg Culex) **22**
 Présence uniquement d'écailles larges sur les veines alaires R2-R3 (sg Melanoconion) **30**
- 22(21) Tarsomères uniformément sombres **23**
 Présence de taches ou d'anneaux clairs au niveau des articulations de certains tarsomères (P3) **26**
- 23(22) Proboscis uniformément sombre **24**
 Proboscis avec tache médiane d'écailles claires ; tergites abdominaux avec étroites bandes basales claires ; possible présence d'écailles claires aux articulations tarsales P3 chez certains spécimens **Culex chidesteri**
- 24(23) Tergites abdominaux avec au moins sur les segments terminaux, une bande basale claire ... **25**

- Tergites abdominaux avec uniquement des taches basolatérales claires..... **Culex
inflictus**
- 25(24) Tergites abdominaux avec bandes basales claires en ½ lune, peu ou pas connectées avec les taches latérales, pleures avec des taches d'écailles claires..... **Culex
quinquefasciatus**
Tergites abdominaux avec bandes basales claires étroites et élargies latéralement sur derniperes tergites abdominales, parfois limitées à des taches latérobasales, pleures avec très peu ou pas d'écailles . **Culex nigripalpus**
- 26(22) Absence d'écailles claires sur le proboscis (possible présence d'écailles claires sur la face ventrale) **27**
Présence d'écailles claires sur la partie médiane du proboscis formant un anneau plus ou moins net..... **28**
- 27(26) Tarses P3 avec de nets anneaux clairs aux articulations ; tergites abdominaux avec étroites bandes basales et taches latérobasales claires **Culex secutor**
Tarses P3 avec des petites taches blanches aux articulations ; tergites abdominaux avec bandes claires basales étroites, parfois élargies en leur milieu, et taches latéro-basales ; pleures avec des taches sombres sur le tégument formant 2 lignes longitudinales **Culex declarator**
- 28(26) Tergites abdominaux avec larges bandes basales claires..... **Culex bahamensis**
Tergites abdominaux avec étroites bandes basales claires, avec ou sans taches latérobasales **29**
- 29(28) Tergites abdominaux avec étroites bandes basales et taches latérobasales claires ; tarses étroitement annelés à la base et à l'apex..... **Culex corniger**
Tergites abdominaux avec étroites bandes basales claires uniquement ; tarses ornés d'étroites bandes claires basales et apicales, sauf articulation T4-T5 de P3 ... **Culex habilitator**
- 30(21) Tergites abdominaux avec bandes basales claires très étroite ou limitées à des petites taches **Culex elevator**
Tergites abdominaux avec taches basolatérales claires
Culex atratus, Culex bastagarius, Culex idottus, Culex madininensis

1.5. Annexe 17 : Encadrement d'une stagiaire de Master 2 Biologie Santé, Option santé en milieu tropical (Université des Antilles, Faculté des Sciences Exactes et Naturelles)

Université des Antilles
Faculté des Sciences Exactes et Naturelles
Master Biologie Santé, Option Santé en milieu Tropical

Mémoire de fin d'études



Dynamique d'infection du moustique *Culex* par le virus West Nile

Préparé par Naomie PATURE

Sous la direction de : Sylvie LECOLLINET & Lise FIACRE

Équipe d'accueil : UMR ASTRE, Centre de recherche et de veille sur
les maladies vectorielles dans la Caraïbe

Date de soutenance : 28 juin 2022



ANNEE UNIVERSITAIRE : 2021-2022

Dynamique d'infection du moustique *Culex* par le virus West Nile

Présenté par Naomie PATURE

Sous la direction de Sylvie Lecollinet, Chercheur
et le tutorat de Lise Fiacre, Doctorante

Mémoire présenté le 28 juin 2022

Mémoire de Master en Biologie-Santé, Mention Santé en milieu tropical

REMERCIEMENTS

*Je remercie tout particulièrement **Madame Sylvie LECOLLINET** ma directrice de stage, Virologue, ainsi que **Madame Lise FIACRE**, Doctorante, pour m'avoir accompagné, écouté, conseillé et soutenu durant toute cette période de stage.*

*Je tiens également à remercier l'entomologiste **Monsieur Nonito PAGES**, directeur du Centre de recherche et de veilles des maladies vectorielles dans la Caraïbe (CRVC), qui en dépit de sa quantité de travail éprouvante a su dégager du temps afin de faire progresser mes recherches.*

Je remercie vivement toute l'équipe de l'UMR ASTRE du CRVC pour leur accueil, leur convivialité, leur esprit d'équipe, sans qui je n'aurais pu m'épanouir au sein de l'entreprise.

*Je désire remercier **Monsieur Olivier GROS**, Professeur de l'Université des Antilles de nous avoir permis à moi ainsi qu'à toute la promotion d'avoir pu réaliser un stage dans le cadre de notre parcours, ainsi que **Madame Catherine HERMANT**, Chercheur à l'Université des Antilles spécialisée dans la microscopie confocale, pour avoir contribué à la construction de ma démarche expérimentale et à l'acquisition de mes observations microscopiques.*

Enfin, je remercie chaleureusement mes parents, tout particulièrement ma mère, sans les encouragements de qui, je n'aurais pas pu venir à bout de ce mémoire.

Merci à tous d'avoir contribué de loin, comme de près à la rédaction de ce rapport

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN / ADNc	Acide DésoxyRibonucléique / ADN complémentaire
ARN	Acide RiboNucléique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CD	Cellule Dendritique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
HDR/SVpA	Ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi du signal de polyadénylation du virus 40 simien
IgG / IgM	Immunoglobuline G / Immunoglobuline M
IFN	Interféron
IL-	Interleukine
ISA	Infectious Subgenomic Amplicons / Amplicons Subgénomique Infectieux
kDa	kiloDalton
LT / LB	Lymphocyte T / Lymphocyte B
MMPPs	Métalloprotéinase matricielles
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns / Motifs moléculaires associés aux pathogènes
pCMV	Promoteur du cytomégalovirus humain
PRRs	Pattern Recognition Receptors / Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
RE	Reticulum endoplasmique
RLR	RIG-I-like Receptors / Récepteurs RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TCID ₅₀	50% Tissue Culture Infectious Dose
TLR	Toll-Like Receptors
TNF	Tumor necrosis factor / Facteur de nécrose tumoral
SVF	Sérum de Veau Foetal
SNC	Système nerveux central
VWN	Virus West Nile

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	I
LISTE DES ABREVIATIONS	II
CHAPITRE I : INTRODUCTION	0
I.1. Contexte général.....	0
I.2. Epidémiologie.....	1
I.2.1. Le VWN dans le monde.....	1
I.2.2. Le VWN en Guadeloupe.....	1
I.3. Classification virale.....	3
I.4. Structure génomique	3
I.4.1. Les protéines structurales	4
I.4.2. Les protéines non structurales	5
I.5. Cycle viral	5
I.5.1. Adhésion, pénétration et fusion du virion	6
I.5.2. Association du complexe de réplication.....	6
I.5.3. Maturation et relargage extracellulaire	7
I.6. Écologie et tropisme chez le vecteur	7
I.6.1. Cycle de transmission viral	7
I.6.2. Le réservoir	8
I.6.3. Le vecteur.....	8
I.7. Pathogénèse, dissémination chez les mammifères.....	10
I.8. Réponse immunitaire face au virus West Nile.....	11
I.8.1. Système immunitaire inné.....	11
I.8.2. Système immunitaire adaptatif	12
I.9. Utilisation de méthodes de génétique inverse pour étudier le virus West Nile.....	12
CHAPITRE II : OBJECTIFS DU STAGE	14
CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.....	15
III.1. Constructions de virus fluorescents.....	15
III.2. Analyse de la fluorescence <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	18
III.3. Cinétique d'infection.....	21
CHAPITRE IV : RESULTATS	23
IV.1. Construction de virus codant pour une protéine de fluorescence	23
IV.2. Production de virus infectieux exprimant de la fluorescence dans les cellules infectées	23
IV.3. Suivi de l'infection virale par immunofluorescence indirecte dans les cellules infectées	25
IV.4. Mise au point de la transparasitisation du moustique <i>Culex</i>	26
CHAPITRE V : DISCUSSION	27
CHAPITRE VI : CONCLUSION	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	36

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I.1. Contexte général

Le virus du Nil Occidental, aussi connu sous le nom de virus West Nile (VWN) est un arbovirus (arthropod-borne virus) de la famille des *Flaviviridae* appartenant au complexe sérologique de l'encéphalite japonaise (comprenant entre autres les virus de la fièvre jaune, l'encéphalite à tiques, la dengue, ...) (J. Sejvar *et al*, 2016). Le virus est maintenu dans un cycle enzootique entre les moustiques et les hôtes vertébrés, en particulier les oiseaux. C'est un virus zoonotique ayant un impact majeur en santé humaine et animale (L. Fiacre *et al*, 2020). En effet, il peut être transmis à des hôtes occasionnels comme les chevaux ou l'Homme, qui sont des « culs-de-sac épidémiologiques » qui ne retransmettront pas le virus à des moustiques. Une surveillance du VWN est mise en place dans le but de prévenir une transmission interhumaine par le biais de dons d'organes, de transfusion sanguine ou encore de l'allaitement (J.J. Young *et al*, 2019). Les individus touchés par le VWN sont pour la plupart asymptomatiques ($\approx 80\%$) mais peuvent développer un état fébrile, voire une infection du système nerveux central (SNC). Dans environ 1% des infections, et majoritairement chez les personnes âgées, l'atteinte du SNC entraîne des complications neurologiques sévères comme les méningo-encéphalites ou encore une paralysie flasque aiguë, qui peuvent empirer et mener à la mort (L. Fiacre *et al*, 2020, H. Kampen, 2020). Suite à son introduction aux États-Unis, et plus particulièrement face à l'épidémie qui a eu lieu à New York en 1999 causant la mort de 19 oiseaux captifs, 27 oiseaux sauvages et 59 cas chez l'Homme (D. Nash *et al*, 2001; G.V. Ludwig *et al*, 2002; K.E. Steele *et al*, 2000), le VWN devient un sujet d'intérêt pour la communauté scientifique.

L'essor des techniques de biologie moléculaire telles que la PCR ou RT-PCR et la transfection cellulaire, au cours des années 80s, a permis de faciliter l'analyse de génomes viraux à ARN comme le VWN ou le virus de la fièvre jaune. L'utilisation d'outils de génétique permet d'étudier les déterminants génétiques modulant la réplication ou la virulence, notamment chez les *flavivirus* (T. Atieh *et al*, 2017).

Bien que la structure et le mode de transmission du VWN soient bien connus, les mécanismes moléculaires à l'origine de sa virulence ou influant sur la compétence vectorielle des vecteurs restent à approfondir. Cette étude vise à fournir de plus amples informations sur le tropisme viral chez le moustique *Culex quinquefasciatus* grâce à l'utilisation d'approches innovantes d'imagerie de fluorescence.

I.2. Épidémiologie

I.2.1. Le VWN dans le monde

Le virus West Nile a été identifié pour la première fois dans le district du Nil Occidental en Ouganda en 1937 ; c'est l'arbovirus le plus répandu dans le monde (Figure a) (K.C. Smithburn *et al*, 1940).

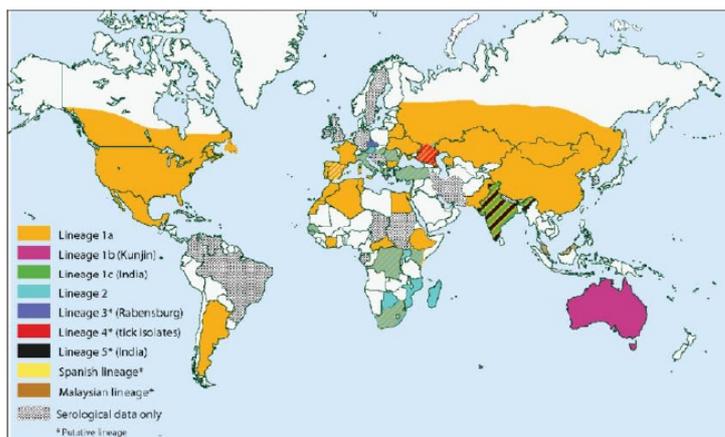


Figure a. Répartition géographique mondiale du virus West Nile, (A.T. Ciota *et al*, 2013)

Historiquement retrouvé uniquement dans l'Ancien Monde, la plus grande épidémie de VWN a eu lieu en Europe. En effet, c'est à l'aube des années 50, que débutent les premières circulations du VWN dans le bassin Méditerranéen, plus précisément en Égypte que ce soit chez l'Homme, les oiseaux ou les moustiques (R.M. Taylor *et al*, 1956). Puis, dans les années suivantes, le virus est retrouvé plus largement en Israël en 1951 avec 153 cas parmi 303 habitants dont la plupart sont des enfants, mais aussi en France en 1962 où des mortalités chez des équidés ont été recensées (B. Murgue *et al*, 2001 ; Z. Hubalek *et al*, 1999). C'est à l'été 1999 qu'une souche très virulente est retrouvée dans la ville de New York touchant 59 patients qui ont été hospitalisés (Nash *et al*, 2001) ; puis le virus s'est propagé plus largement sur les continents américain et européen les années suivantes. Depuis sa découverte, le virus est présent sur la majorité des continents et est considéré comme l'agent causal le plus important d'encéphalites virales dans le monde (C.Chancey *et al*, 2015)

I.2.2. Le VWN en Guadeloupe

Le 1^{er} cas d'encéphalite chez l'Homme causé par le VWN dans les Caraïbes a été rapporté en 2001 dans les îles Caïmans. Puis en 2002, suite à une étude sérologique menée sur les chevaux et les oiseaux en Guadeloupe, des anticorps dirigés contre le VWN ont été isolés dans leur sérum. (T. Lefrançois *et al*, 2006). En effet, une augmentation de la prévalence d'IgG dirigés contre le VWN ($\approx 8,8\%$) a été démontrée lors d'un sérosondage effectué sur 360 chevaux en pleine forme (C.Chancey *et al*, 2015). La Guadeloupe semble alors être une zone où le VWN circule activement. Toutefois, il

faut remarquer que la distribution spatiale hétérogène du VWN lors de l'épizootie de 2002 en Guadeloupe est associée à un risque plus élevé d'infection dans certaines localisations, notamment aux alentours des forêts marécageuses et des mangroves (J. Pradel *et al*, 2009). Entre 2003 et 2007, plusieurs études sérologiques sentinelles ou transversales ont été réalisées sur les chevaux et les oiseaux de façon annuelle ou semestrielle. Malgré les risques de circulation, ces études n'ont pas permis de mettre en avant de forte circulation virale. En 2007, un maintien d'analyses sérologiques sur les équidés et des poules sentinelles selon un rythme annuel a été effectué sur les sites à risque en Guadeloupe.



Figure b. | Pays des Caraïbes et d'Amérique latine où une activité du virus West Nile a été décelée (en noir) entre 2001 et 2004 (Komar *et al*, 2006)

De nouvelles séroconversions ont été détectées sur des chevaux par la suite entre septembre 2007 et août 2008 et entre janvier 2011 et mars 2013 (N. Pagès, 2013). Par ailleurs, une surveillance des moustiques a été mise en place début 2015 afin de suivre la dynamique des populations de



moustiques dans deux sites sentinelles équins et poulets et d'identifier les espèces vectrices impliquées. Malgré ces efforts, le WNV n'a jamais été isolé chez les moustiques, les chevaux et les oiseaux en Guadeloupe. Durant ces suivis, le diagnostic du VWN peut se faire via des outils comme la RT-qPCR ou l'ELISA. Par ailleurs, malgré une distribution importante dans les Caraïbes (Jamaïque, Bahamas, Cuba, Puerto Rico ...)(**Figure b**), peu de cas de maladie humaine liée au VWN ont été recensés (N. Komar *et al*, 2006).

Figure c. | Trajet migratoire des oiseaux empruntant la voie des Caraïbes (Rappole *et al*, 2000)

Ce fait pourrait s'expliquer par la présence de plusieurs flavivirus endémiques qui conféreraient une protection croisée contre une forme grave provoquée par le VWN (J. Sejvar *et al*, 2016) ou par des différences écologiques et épidémiologiques du VWN entre l'Amérique du Nord et les autres territoires américains qui seraient à l'origine d'une plus faible charge virale transmise par les moustiques « ponts » en Amérique centrale et du Sud.

I.3. Classification virale

De par sa grande variété génétique, étudiée à partir d'analyses phylogénétiques, le VWN est classé en 9 lignages dont les lignages 1 et 2 qui sont plus communément retrouvés lors de pathologies chez l'Homme et le cheval (C.Chancey *et al*, 2015). Ces lignages sont catégorisés grâce à plusieurs critères : la distribution géographique, la pathogénicité chez l'hôte mammifère, l'évolution et la biologie du VWN (G. Habarugira *et al*, 2020). Les lignages 3 et 4 regroupent une souche chacun et sont retrouvés en République Tchèque et en Russie respectivement (Lvov D.K. *et al*, 2004, M.T. Aliota *et al*, 2012). Tandis que les lignages 6, 7 et 8 comprennent des souches isolées en Espagne (A. Vazquez *et al*, 2010) et au Sénégal ; à l'origine le virus de Koutango (lignage 7) était considéré comme une espèce de *flavivirus* à part, avant d'être reconnu comme appartenant à la phylogénie du VWN (R.N. Charrel *et al*, 2003). Le dernier lignage est constitué d'une souche provenant d'Autriche dont la pathogénicité chez l'Homme et l'animal n'a pas encore été élucidée (K. Pachler *et al*, 2014).

I.4. Structure génomique

Le virus West Nile, flavivirus au même titre que le virus de la fièvre jaune, le virus de l'encéphalite de Saint Louis ou encore le virus de l'encéphalite japonaise, est un virus enveloppé, qui se compose d'un génome à ARN (Figure d). Le génome du VWN est constitué d'un brin d'ARN linéaire, monocaténaire à polarité positive; il est entouré par une capsidie icosaédrique contenu dans une enveloppe composée d'une bicouche lipidique (Figure e) (G.Valiakos *et al*, 2012). Le génome viral code pour dix protéines structurales et non structurales et il est traduit en une polyprotéine unique qui est clivée par plusieurs protéases virales et cellulaires. Les gènes viraux sont flanqués par des régions non codantes qui ne seront pas traduites en 5' et en 3' (C. Chancey *et al*, 2015). Ces régions, forment des structures secondaires qui sont fondamentales pour la réplication génomique et la traduction protéique (F.Aubry *et al*, 2015).

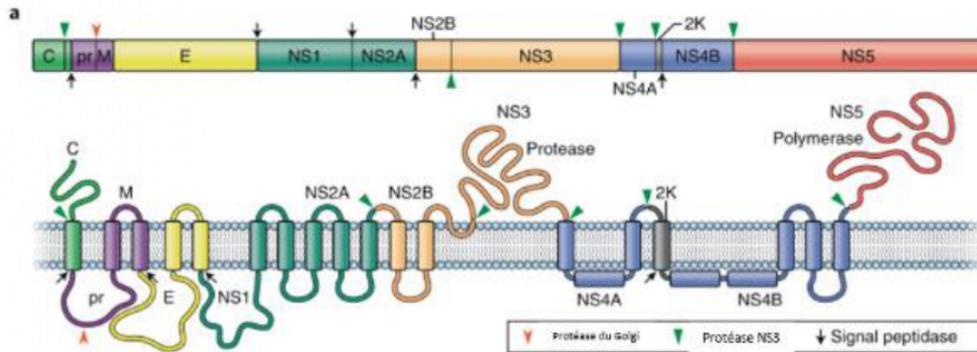


Figure d. | **Structure génomique du virus West Nile.** Le flavivirus code pour un seul cadre de lecture ouvert et est traduit dans le RE en une polyprotéine, qui est clivée par les protéases virales et cellulaires. Résultante de dix protéines structurales et non structurales. (adapté en français de T.C. Pierson *et al*, 2020)

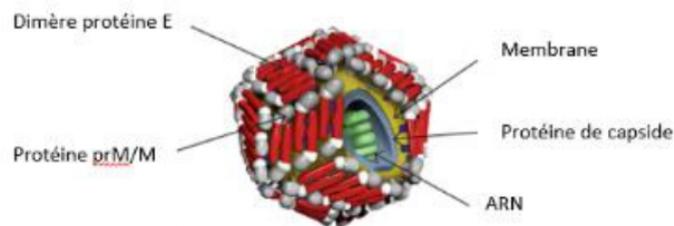


Figure e. | **Composition du virion du virus West Nile** (adapté en français de C.Chancey *et al*, 2015)

1.4.1. Les protéines structurales

Les protéines structurales se situent dans la partie N-terminale de la polyprotéine produite lors de la traduction du génome viral. Ensemble, ces protéines jouent un rôle majeur dans l'entrée et la sortie du virion formé (L.Fiacre *et al*, 2020).

La protéine de capsid C fait 11 kDa et ses régions N- et C- terminales sont séparées par une région interne hydrophobe impliquée dans la structuration de la capsid (L. Ma *et al*, 2004). Elle est associée au matériel génétique et est impliquée dans la réplication et la dissémination virale (G. Habarugira *et al*, 2020).

La protéine E est ancrée à l'enveloppe et protège les composants viraux en maintenant l'intégrité de l'enveloppe. Elle est très immunogénique et joue un rôle crucial dans l'entrée viral dans la cellule hôte, c'est pourquoi la protéine E est la principale cible utilisée dans la plupart des vaccins (vaccins recombinants, inactivés, ...).

La protéine prM/M est une petite protéine glycosylée transmembranaire associée à la bicouche lipidique du virion. La protéine M est issue du clivage de la protéine prM par la furine à l'intérieur de

l'appareil de Golgi. La protéine prM, présente à la surface du virion immature, jouerait un rôle en empêchant la fusion précoce des protéines E avec la membrane cellulaire de l'hôte lors de l'exocytose des virions (D.W.C. Beasley *et al*, 2005).

I.4.2. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales interviennent dans plusieurs mécanismes moléculaires tels que l'assemblage du virion, l'échappement du système immunitaire et la multiplication intracellulaire (L.Fiacre *et al*, 2020, M.A. Brinton, 2013).

La protéine NS1 est un cofacteur sécrété de façon importante et qui aurait plusieurs actions en fonction de sa localisation. En effet, située à l'intérieur de la cellule, NS1 est indirectement impliquée dans la réplication virale et la maturation des virions (D.A. Muller *et al*, 2013). Tandis que la forme extracellulaire permettrait la régulation et l'échappement du système immunitaire inné en agissant sur le complément (G. Habarugira *et al*, 2020).

La protéine NS2A est une protéine membranaire multifonctionnelle qui influe sur la réplication virale en supprimant la transcription de l'interféron β (IFN- β) impliqué dans la première ligne de défense de l'hôte ; alors que NS2B sert de cofacteur à la protéine NS3 afin d'assurer son activité de protéase virale (J. S. Mackenzie *et al*, 1998 ; W.J. Liu *et al*, 2003).

NS3 possède une activité hélicase à ARN nécessaire à la réplication du génome viral et à l'assemblage du virion. De plus, son action protéolytique sera à l'origine du clivage de la polyprotéine néosynthétisée (M.C.Lanteri *et al*, 2011). Le rôle de la protéine NS4A n'est pas clairement défini, cependant c'est une petite protéine transmembranaire non conservée qui participerait au réarrangement de la membrane virale et interagirait avec NS1 pour produire l'ARN viral (S. Miller *et al*, 2007 ; L. Zhong *et al*, 2017). Similairement à la protéine NS2A, NS4B assure l'échappement immunitaire du VWN à travers une perturbation de la signalisation des IFN de type I. (M.A. Martin-Acebes *et al*, 2012).

Enfin, la protéine NS5, la plus longue et la plus conservée de toutes les protéines non structurales, a de multiples propriétés enzymatiques dont une activité ARN polymérase dépendante d'ARN (M. De Filette *et al*, 2012).

I.5. Cycle de réplication virale

Plusieurs types cellulaires de diverses espèces (mammifères, avifaune, amphibiens etc ...) peuvent être la cible du VWN et servir de lieu de réplication virale (Figure f).

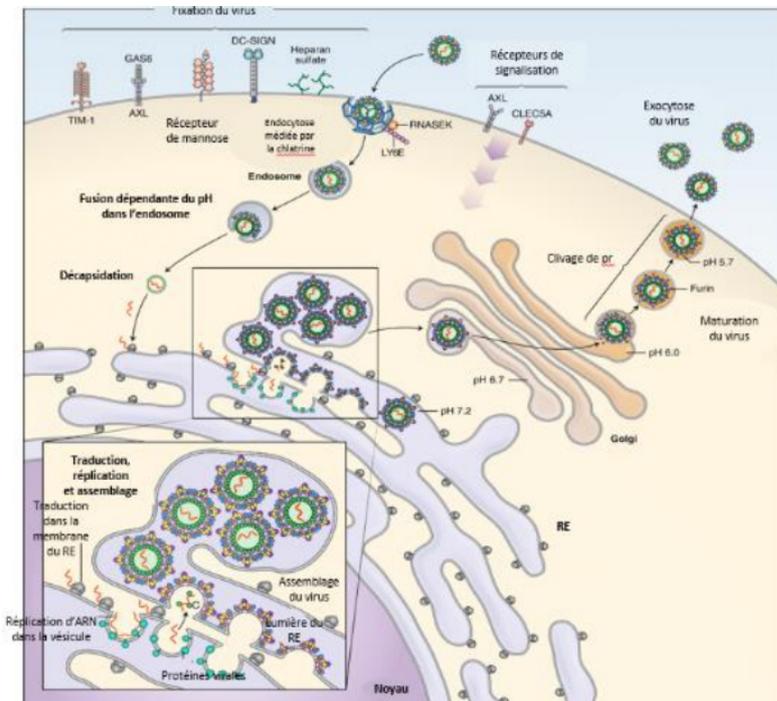


Figure f. | Le cycle de réplication des flavivirus. Les flavivirus infectent les cellules de mammifères avec plusieurs types de facteurs de fixation, incluant des molécules qui se lient à la membrane. Les virions sont internalisés par des mécanismes dépendants de clathrine qui miment les facteurs de l'hôte. La fusion virale avec la membrane de l'hôte se produit dans d'endosome et est dépendant du pH. Les particules virales se rassemblent et bourgeonnent dans le RE et migrent hors de la cellule. La maturation du virion,

elle, se fait via le clivage de la protéine prM par une protéase de type furine dans le cytoplasme. (adapté en français de T.C.Pierson *et al*, 2020)

1.5.1. Adhésion, pénétration et fusion du virion

Le début du cycle de réplication du VWN se fait via l'entrée du virus par l'intermédiaire de la liaison de la protéine E à un récepteur cellulaire (glycoaminoglycanes, lectines de type C) de l'hôte. Puis, par un phénomène d'endocytose médié par la clathrine suivie d'une fusion avec l'endosome précoce, le pH acide de celui-ci entraîne des changements conformationnels de la protéine E. Des études démontrent qu'après la fusion entre la membrane virale et la membrane endosomale via la protéine E, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme (H. Cho *et al*, 2012).

1.5.2. Association du complexe de réplication

L'ARN viral cytoplasmique est ensuite traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte ; ainsi la polyprotéine synthétisée est clivée à plusieurs endroits par la sérine protéase virale NS3 et par plusieurs protéases de l'hôte dans le lumen du réticulum endoplasmique (RE) (G.Valiakos *et al*, 2012). Lors de la phase précoce du cycle viral, l'ARN viral est utilisé de deux manières : pour effectuer la traduction et servir de modèle à la production de nouveaux brins de polarité positive à partir de brins complémentaires de polarité négative via une ARN polymérase ARN-dépendante. Puis

la protéine C se lie et s'enroule autour de l'ARN néosynthétisé afin de former la nucléocapside qui sera elle-même enveloppée par la membrane du RE au niveau des paquets vésiculaires (M.A. Martin-Acebes *et al*, 2012). A ce stade, les protéines E et prM forment des structures rugueuses sur ces virions immatures (Figure g) puis, ce complexe bourgeonne dans la lumière du RE grâce aux invaginations de ce dernier. Les virions formés se dirigent vers l'appareil de Golgi afin de subir leur maturation.

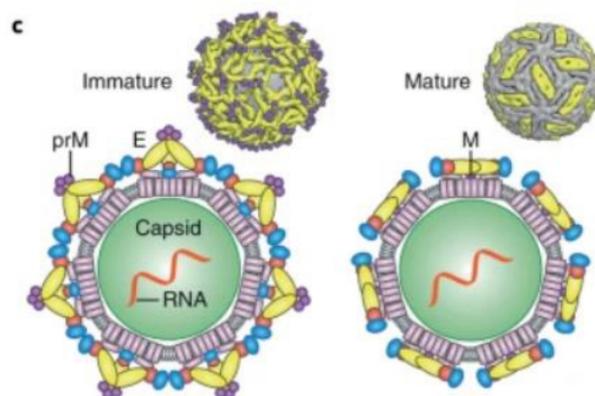


Figure g. Représentation de la disposition des protéines E sur la forme immature et mature du virion (T. C. Pierson *et al*, 2020)

1.5.3. Maturation du virion et relargage extracellulaire

Les compartiments acides du réseau transgolgien permettent aux virions de devenir matures et potentiellement infectieux. Lors du bourgeonnement dans l'appareil de Golgi, les homodimères prM/E présents à la surface des virions leur confèrent un aspect rugueux. L'acidification du pH des vésicules provoque des changements conformationnels à l'origine du clivage des protéines prM par une protéase de type furine de l'hôte. Le peptide prM est sécrété tandis que la protéine M est retenue dans la membrane du virion (G. Habarugira *et al*, 2020). Après dissociation des protéines prM/M de la particule, le virion est libéré dans la matrice extracellulaire par exocytose (G. Wengler, 1989).

1.6. Écologie et tropisme de vecteurs

1.6.1. Cycle de transmission virale

L'arbovirus est principalement transmis dans un cycle enzootique naturel entre le réservoir amplificateur et l'arthropode vecteur (Figure h). Ainsi, le vecteur se nourrit sur un oiseau infecté qui a développé une virémie suffisante pour transmettre le virus. Par ailleurs, une transmission directe, par voie féco-orale entre oiseaux a été décrite (N. Komar *et al*, 2003). Après une certaine période

d'incubation, appelé période d'incubation extrinsèque, le vecteur devient compétent et est à même d'inoculer le virus à un hôte vertébré, principalement l'oiseau. Cependant, certains vecteurs se nourrissant sur des mammifères ou des reptiles, peuvent accidentellement leur transmettre le virus. Il est également démontré qu'une transmission directe du virus entre les Hommes est possible par dons d'organes, transfusion, allaitement ... (J.J. Young *et al*, 2019).

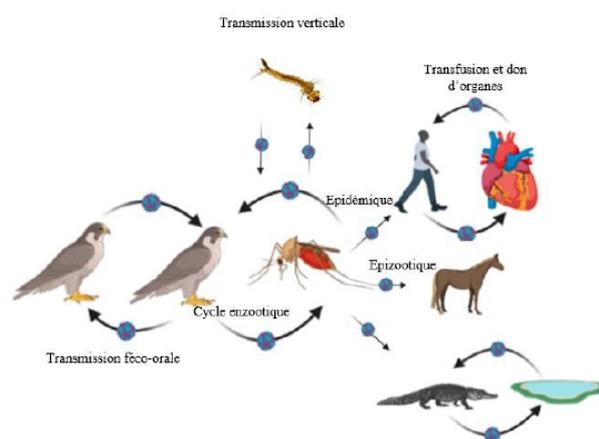


Figure h. | **Cycle de transmission du virus West Nile.** L'amplification enzootique naturelle du VWN par les oiseaux (réservoirs) et les moustiques vecteurs compétents se fait par une transmission oro-fécale entre oiseaux et par gorgement de moustiques sur des oiseaux infectés. La transmission verticale par les moustiques fournirait un mécanisme d'hivernage du moustique. Les Hommes et les chevaux sont considérés comme des «culs-de-sac épidémiologiques». La transmission inter-humaine pourrait se faire via des transfusions sanguines, des greffes d'organes, l'allaitement ou encore *in utero*. Dans de rares cas, des études démontrent la présence du VWN chez certains reptiles. (adapté de C. Chancey *et al*, 2015 & G. Habarugira *et al*, 2020)

1.6.2. Le réservoir

Avec une durée de virémie de l'ordre de quelques jours, il existe plus de 326 espèces d'oiseaux qui peuvent multiplier le VWN avec des charges virales différentes en fonction de l'espèce (L. Fiacre *et al*, 2020). Ainsi, les falconiformes, les accipitriformes et les passériformes ont une virémie suffisante pour infecter de nouveaux moustiques tandis que les ansériformes, les columbiformes et les piciformes sont résistants vis-à-vis de l'infection et développent une virémie trop faible pour qu'ils aient un impact dans le cycle épidémiologique du VWN (N. Komar *et al*, 2003, S. Zientara *et al*, 2011).

1.6.3. Le vecteur

Le principal arthropode vecteur responsable de la transmission du VWN est le moustique du genre *Culex*. En effet, plusieurs études ont démontré que le virus est majoritairement retrouvé chez le genre *Culex* et a été isolé chez plus de 58 espèces de moustiques (E.B. Hayes *et al*, 2005 ; J. Sejvar *et*

al, 2016). L'espèce vectrice qui transmet essentiellement le pathogène dans les régions du sud des États-Unis est l'espèce *Culex quinquefasciatus* (Figure i).



Figure i. Photographies du moustique *Culex quinquefasciatus* (<https://alchetron.com/Culex-quinquefasciatus> & Stephen Doggett, Medical Entomology, Pathology West – ICPMR Westmead)

Pour considérer une espèce comme vectrice, il est important de prendre en compte la compétence vectorielle qui se caractérise par l'aptitude d'un arthropode vecteur à transmettre un virus et la capacité vectorielle qui reflète l'efficacité de la transmissibilité virale (Lanteri *et al*, 2011). Cette dernière est influencée par de nombreux facteurs environnementaux, tels que l'abondance et le tropisme d'hôtes, la température. Un vecteur dit compétent doit ingérer, assurer la réplication et propager l'agent pathogène via une transmission biologique. En effet, une fois qu'il a été ingéré lors d'un repas sanguin, le virus migre vers le mésentéron du moustique où il pénètre dans les cellules épithéliales intestinales et se réplique (L.Fiacre *et al*, 2020). Puis, les particules virales traversent la barrière intestinale et se disséminent dans l'hémolymphe afin d'infecter d'autres organes. Une fois dans l'hémocoèle, les molécules virales infectent les cellules des glandes salivaires, s'y répliquent et sont libérées dans le canal salivaire permettant ainsi leur transmission via la salive à un hôte vertébré (Figure j) (A. Vega-Rua, 2021, non publié).

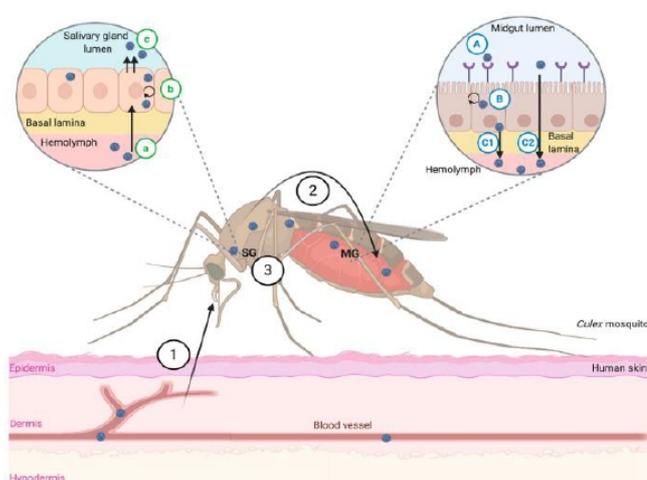


Figure j. Dissémination du virus West Nile chez le moustique. (1) Le moustique se nourrit sur un hôte infecté. (2) Le pathogène infecte le mésentéron du moustique via une liaison virale sur les cellules épithéliales (A) par un récepteur protéique. (3) Le virus se réplique dans les cellules intestinales (B) et migrent vers les glandes salivaires par l'hémolymphe (a). Le virus s'y réplique et est relargué (c) dans le canal salivaire avec ou sans apoptose des cellules épithéliales (L. Fiacre *et al*, 2020)

I.7. Pathogenèse, dissémination chez les mammifères

La transmission virale s'effectue naturellement entre les moustiques et les oiseaux ; le cycle commence lorsqu'un moustique se nourrit à partir d'un oiseau infecté, dit compétent ou amplificateur, par le virus.

Il existe 3 phases de pathogenèse virale : la phase précoce, la phase de dissémination viscérale et la l'infection du système nerveux central (Figure k)(M.S. Suthar *et al*, 2013). Afin de se répliquer dans l'organisme de l'hôte, le VWN doit franchir plusieurs barrières anatomiques qu'elles soient physiques, chimiques ou génétiques.

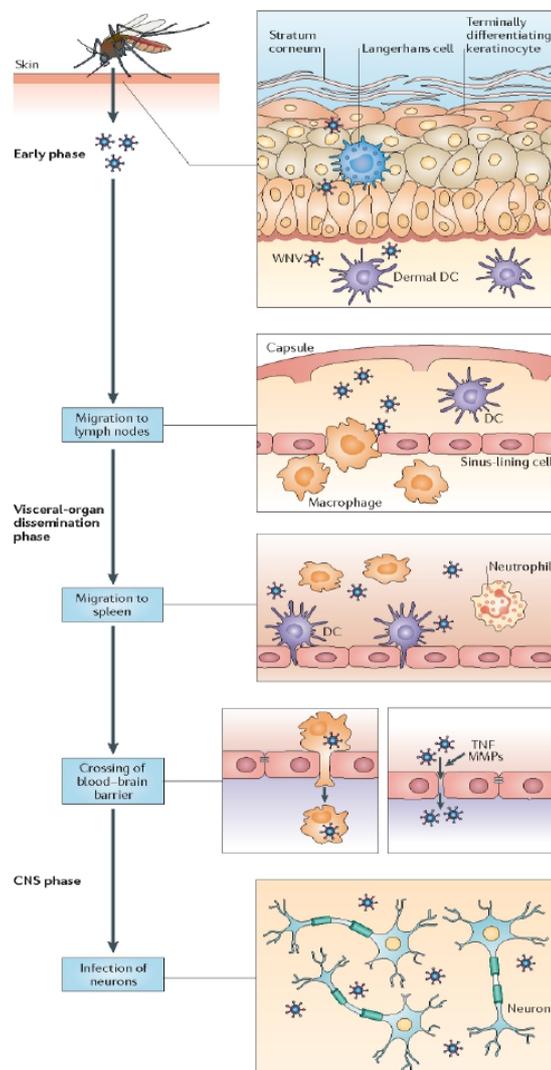


Figure k. Pathogenèse du virus West Nile chez l'Homme. Suite à une piqûre d'un moustique, le VWN se multiplierait dans les kératinocytes et les cellules dendritiques (CDs) et les cellules de Langerhans. Les CDs infectées migrent au niveau des ganglions lymphatiques et y sèment le virus. La réplication dans les ganglions lymphatiques entraîne une virémie et une infection subséquente des organes périphériques, tels que la rate ou encore le foie et les reins. Au 4^{ème} jour, la réplication virale atteint un pic dans le sérum et la rate. Entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour après l'infection, le VWN est éliminé des organes périphériques, et le virus infectieux est détecté dans le cerveau et la moelle épinière, en partie en raison de sa traversé de la barrière hémato-encéphalique. Ceci est obtenu par une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (via la sécrétion du facteur de nécrose tumoral (TNF), par la rupture des jonctions cellulaires endothéliales (via l'action de métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou par le biais d'un mécanisme du « cheval de Troie », où le virus est transporté vers le système nerveux central (SNC) par les cellules immunitaires infectées. Dans le SNC, le VWN infecte et cause des dommages aux neurones du tronc cérébral, l'hippocampe, le cortex, le cervelet et la moelle épinière. (M.S. Suthar *et al*, 2013)

Après l'inoculation de l'arbovirus au niveau de la peau, le VWN se réplique à l'intérieur des kératinocytes et des cellules de Langerhans. Les particules virales vont migrer vers les ganglions lymphatiques et entraînent une virémie primaire.

Après s'être retrouvé dans le sang, a lieu une phase de dissémination systémique où le VWN se propage vers les organes viscéraux périphériques où il infectera les cellules épithéliales rénales et les macrophages de la rate.

Enfin, le virus peut parfois franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) et se retrouver dans le cerveau. En effet, l'atteinte du SNC peut se faire par cinq mécanismes différents, qui sont : (1) l'amélioration de l'attachement et de l'internalisation du virus par les cellules endothéliales – passage transcellulaire –, (2) la perte de l'intégrité de la BHE et perméabilisation de celle-ci – passage paracellulaire –, (3) le mécanisme de « cheval de Troie » où le virus est transporté vers le SNC par les cellules immunitaires infectées, (4) l'infection des neurones olfactifs étendue à l'infection des bulbes olfactifs, (5) le transport axonal rétrograde.

I.8. Réponse immunitaire face au virus West Nile

La réponse immunitaire chez l'hôte mammifère débute au niveau des cellules de Langerhans, dans l'épiderme à la suite de l'injection du VWN lors du repas sanguin d'un moustique infecté. Ces cellules sont le premier lieu de répllication virale. Les virus ou encore les cellules infectées vont exprimer à leur surface des motifs PAMPs qui vont être reconnus par les récepteurs PRRs des cellules immunitaires sentinelles (cellules dendritiques, macrophages). Le VWN pénètre également au niveau du derme où il rencontre les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques du derme ou encore les macrophages. L'ensemble de ces cellules, après reconnaissance du virus, induisent la transcription et la traduction de gènes cibles codant pour des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que IFN- β , TNF- α ...

I.8.1. Système immunitaire inné

L'activation des réponses immunitaires innées et adaptatives intracellulaires à la suite d'une infection au VWN se fait par le biais de quatre grandes voies : la voie de signalisation dépendante des récepteurs RIG-I-like (RLR) ; la voie de signalisation dépendante des récepteurs Toll-like (TLR) ; la réponse anti-VWN médiée par l'IFN de type I ; les récepteurs NOD-like (M.S.Suthar *et al*, 2013). Chez le moustique, la voie JAK/STAT (à l'origine d'une cascade de phosphorylation via une transduction de signal à travers un récepteur trans-membranaire couplé à une enzyme janus kinase et une protéine

STAT) est utilisée dans la réponse immunitaire face au VWN. Mécaniquement, dans les cellules de moustiques *Culex*, la réponse immunitaire au VWN utilise une molécule sécrétée appelée Vago qui, comme l'interféron chez les mammifères, est supposée agir comme un deuxième messager pour activer la voie JAK/STAT. Enfin, l'apoptose, une réponse immunitaire immédiate, se produit dans les glandes salivaires et l'intestin moyen des moustiques *Cx. quinquefasciatus* pour contrôler la charge virale (L. R. H. Ahlers & A. G. Goodman 2018).

I.8.2. Système immunitaire adaptatif chez les vertébrés

La réponse immunitaire adaptative à la suite de l'infection au VWN est induite à la suite de la présentation des peptides antigéniques par les cellules présentatrices d'antigène au niveau des lymphocytes T CD4⁺. Ces cellules sont des éléments essentiels de l'enclenchement de la réponse adaptative. Elles entrent en interaction directe avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et se différencient afin de former entre autres des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires. Les lymphocytes B (LB) reconnaissent directement les pathogènes par leur CMH de classe II et présentent le peptide antigénique aux LT auxiliaires, ce qui permet l'activation des LB. Les LB actifs peuvent alors également se différencier en lymphocytes B mémoires dans le but de mieux réagir lors d'une nouvelle infection, ou alors se différencier en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps permettant l'élimination de l'agent pathogène. Enfin, les LT CD8⁺ sont activés par les LT CD4⁺ actifs notamment par des cytokines comme l'IL-2, permettant alors au LT CD8⁺ de se différencier en cellule mémoire ou en cellule cytotoxique entraînant la lyse du pathogène. L'ensemble de ces réactions concourt à limiter l'infection par le VWN, en limitant sa réplication, sa dissémination ainsi que la virémie de l'hôte tout en essayant de prévenir et limiter la neuroinvasion.

I.9. Utilisation de méthodes de génétique inverse pour étudier le virus West Nile

La génétique inverse est une technique permettant de générer des virus infectieux. Dans le but d'analyser des gènes viraux, des séquences non codantes ou pour étudier les phénomènes de pathogenèse ou de transmission, la génétique inverse constitue un outil de choix (F. Aubry *et al*, 2015). Depuis les années 80s, avec l'essor des infections par les *flavivirus*, plusieurs techniques de développement de clones infectieux viraux ont vu le jour. En effet, en 1981, Racaniello *et al*, prouvent pour la première fois que des fragments d'ADNc entiers d'un virus à ARN de polarité positive pouvaient générer des virus infectieux après transfection dans des cellules de mammifères (Racaniello *et al*, 1981). Suit la mise en place de la PCR en 1986 qui permet la simplification du

clonage grâce à l'utilisation de plus petites quantités d'ARN viral extrait (Mullis *et al*, 1986). Le développement de méthodes de transfection plus efficaces avec les liposomes cationiques, les premiers modèles de génétique inverse par Rice *et al*, la mise au point de la RT-PCR, l'amélioration des techniques de séquençage et bien d'autres viennent compléter les avancées notables du 20^{ème} siècle (Malone *et al*, 1989, Rice *et al*, 1989, Gritsun & Gould, 1998, Smith *et al*, 1985). La méthode ISA (Infectious Subgenomic Amplicons ou Amplicons Subgénomiques Infectieux) est un outil de génétique inverse qui permet la production de virus infectieux à partir de matériel génomique sans nécessiter de transcription *in vitro* ou de propagation d'ADNc dans une bactérie (F. Aubry *et al*, 2014). Certains flavivirus ayant un génome à ARN de polarité positive, tel que le VWN sont susceptibles d'être infectieux lorsqu'on transfecte le génome entier dans des cellules permissives (F. Aubry *et al*, 2015). Plusieurs études se sont basées sur l'hypothèse validée que transfecter des cellules permissives animales avec des fragments d'ADN double brin chevauchants représentant l'intégralité du génome viral d'ARN, donnerait lieu à une recombinaison spontanée des amplicons suivie d'une production du génome viral complet (Figure 1).

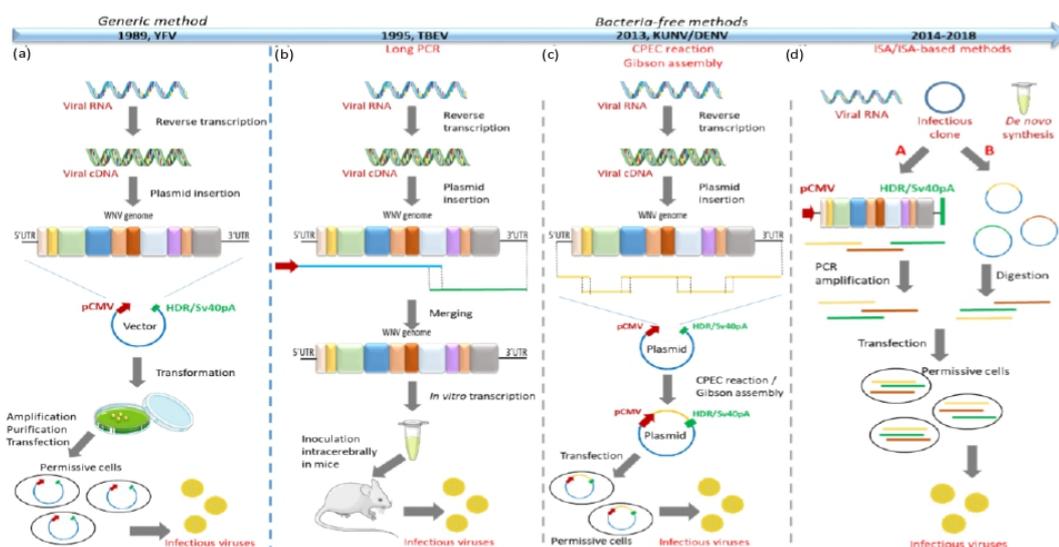


Figure 1. **Évolution des méthodes de génétique inverse.** (A) Dans la méthode ISA, le matériel génétique utilisé peut être de l'ARN viral, des clones infectieux ou une synthèse *de novo*. Les produits PCR qui couvrent l'entièreté du génome sont utilisés pour la transfection directe de cellules permissives (L.Fiacre *et al*, 2020)

CHAPITRE II : OBJECTIFS DU STAGE

Dans un contexte de renforcement des études sur les maladies vectorielles dans les Caraïbes, le projet de ce stage de M2 visait principalement à élaborer des constructions virales fluorescentes par méthode de génétique inverse afin d'étudier le tropisme viral après infection chez le moustique vecteur. Bien que le mode de transmission et la structure du virus West Nile ont fait l'objet de nombreuses études, les mécanismes moléculaires et la dynamique d'infection du virus comportent des zones d'ombres.

Deux étapes clés sont essentielles pour permettre ces analyses. La première consiste à réaliser des constructions virales fluorescentes en utilisant la méthode de génétique inverse ISA. Pour cela, nous avons choisi d'insérer dans le génome viral un gène codant une protéine de fluorescence : soit l'eGFP, soit le mCherry.

La seconde repose sur la mise au point d'une méthode de transparisation de la cuticule du moustique afin de faciliter l'observation de la fluorescence chez le moustique infecté.

A plus grande échelle, ces travaux participent à la mise en place au CRVC d'activités intervenant dans un grand axe de recherche associé à l'interaction entre les vecteurs et les pathogènes. Ainsi, dans un contexte épidémiologique dans la Caraïbe, plus précisément en Guadeloupe, il devient important de mettre en place une caractérisation des vecteurs, des réservoirs et des arbovirus associés.

CHAPITRE III : MATERIEL & METHODES

III.1. Constructions de virus « fluorescents »

III.1.1. Lignées cellulaires

Les cellules Vero (lignée de cellules embryonnaires rénales du singe vert d'Afrique, ATCC CRL-1587) ont été cultivées dans du milieu de culture de base : le DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 5% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et filtré, 1% de sodium-pyruvate, 1% de pénicilline-streptomycine (pen-strep) et 1% de L-glutamine (L-Glu). Les cellules HEK-293T (cellules de rein embryonnaires humaines, ATCC CRL-11268™) ont été cultivées dans le même milieu que les cellules Vero. Les cellules BHK-21 (lignées cellulaires de rein embryonnaires de bébé hamster, ATCC CCL-10™) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté de 10% de SVF et 1% de pen-strep. Toutes les cellules ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Les cellules C6/36 d'*Aedes albopictus* ont été cultivées dans du milieu Leibowitz L-15 supplémenté de 10% de SVF décomplémenté et filtré, 1% de sodium-pyruvate, 1% de pen-strep, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de L-Glu. Les cellules de moustiques ont été incubées à 29°C.

III.1.2. Multiplication du virus et plasmide

La souche virale Israël 98 (IS-98-ST1) isolée à partir d'une cigogne (*Ciconia ciconia*) en 1998 en Israël a été utilisée comme modèle (M. Lucas *et al*, 2004). Pour la technique ISA, le génome viral est sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (pCMV) et possède à son extrémité 3' le ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi du signal de polyadénylation du virus 40 simien (HDR/SV40pA). Il est modifié par l'insertion de gènes supplémentaires : un gène synthétique comprenant un marqueur de fluorescence (GFP ou mCherry), une séquence de nucléotides pour la protéase 2A (virus de la fièvre aphteuse) nécessaire à la maturation du fluorochrome ([Figure I](#)) ainsi qu'une mutation de la protéine C au niveau du seizième acide aminé, matérialisée par la substitution d'une méthionine en thréonine (M16T) en amont du marqueur fluorescent afin de stabiliser la construction. De plus, une insertion des 33 premiers acides aminés de la protéine C (C33) a été effectuée en amont du marqueur de fluorescence afin de garder des molécules *cis* nécessaires pour la cyclisation génomique (Z-R. Zhang *et al*, 2020). Le gène synthétique est construit et intégré dans le vecteur plasmidique pUC57; ce dernier, provenant de la bactérie *Escherichia coli*, est un vecteur communément utilisé pour le clonage.

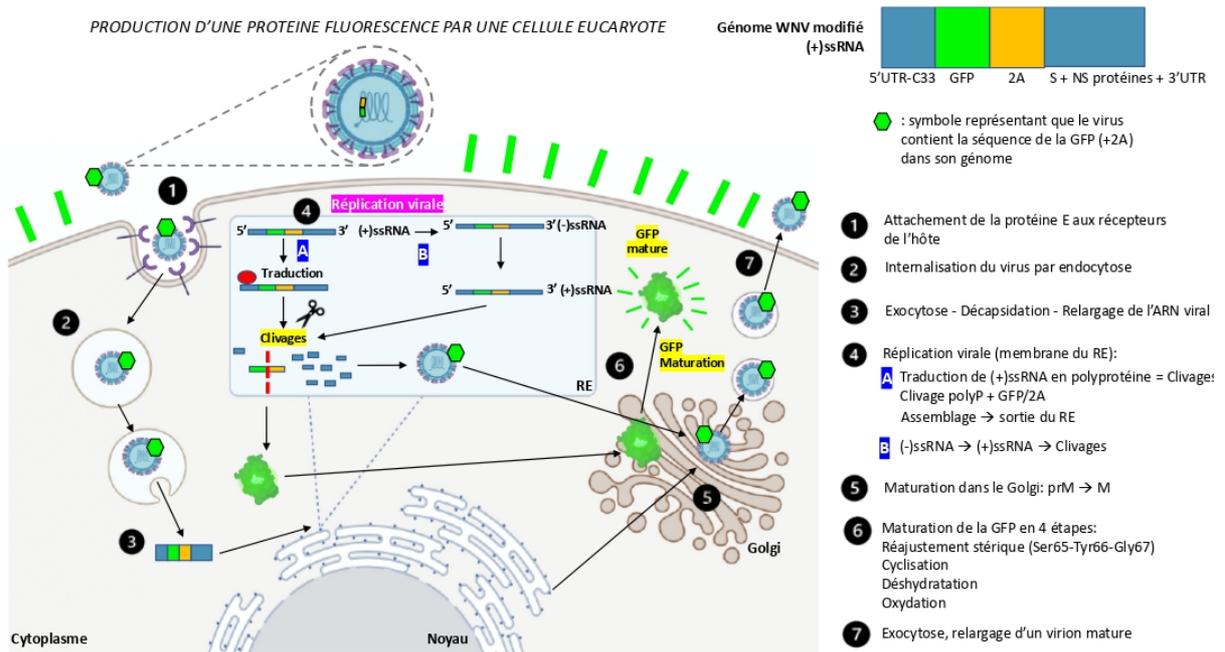


Figure I. Production d'une protéine de fluorescence par une cellule eucaryote (L. Fiacre, non publié, 2022)

III.1.3. Méthode ISA

Production des fragments d'ADN et design d'amorces

Grâce à l'application CLC Sequence Viewer, plusieurs couples d'amorces ont été produits en respectant des critères spécifiques de design. La taille des amorces ne doit pas excéder 25 nucléotides et ne doit pas contenir des successions répétitives de bases (ex : GATTTTTTTTTT). La température d'hybridation est aux alentours de 60°C et le pourcentage de nucléotides G (guanine) et C (cytosine) se situe entre 40 et 60%. Il est important de bien cibler les séquences cibles en amont et en aval du fragment d'intérêt pour une hybridation optimale (Figure II)(A. Rodriguez *et al*, 2015).

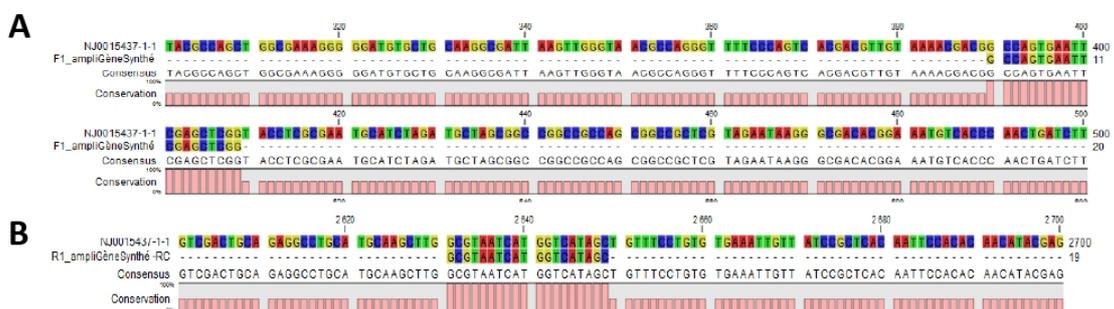


Figure II. Alignement de séquences de nucléotides et courbes de conservation du génome viral modifié et les amorces Forward_ (A) et Reverse_ (B) du gène synthétique contenant le marqueur de fluorescence eGFP.

Pour la méthode ISA, deux constructions ont été conçues possédant cinq fragments (de 2138 pb, 3100 pb, 4271 pb, 3462 pb, et 200pb) et six fragments (de 2138 pb, 3100 pb, 2997 pb, 1349 pb, 3562 pb et 200pb) chevauchants à transférer dans des cellules permissives (Figure III).

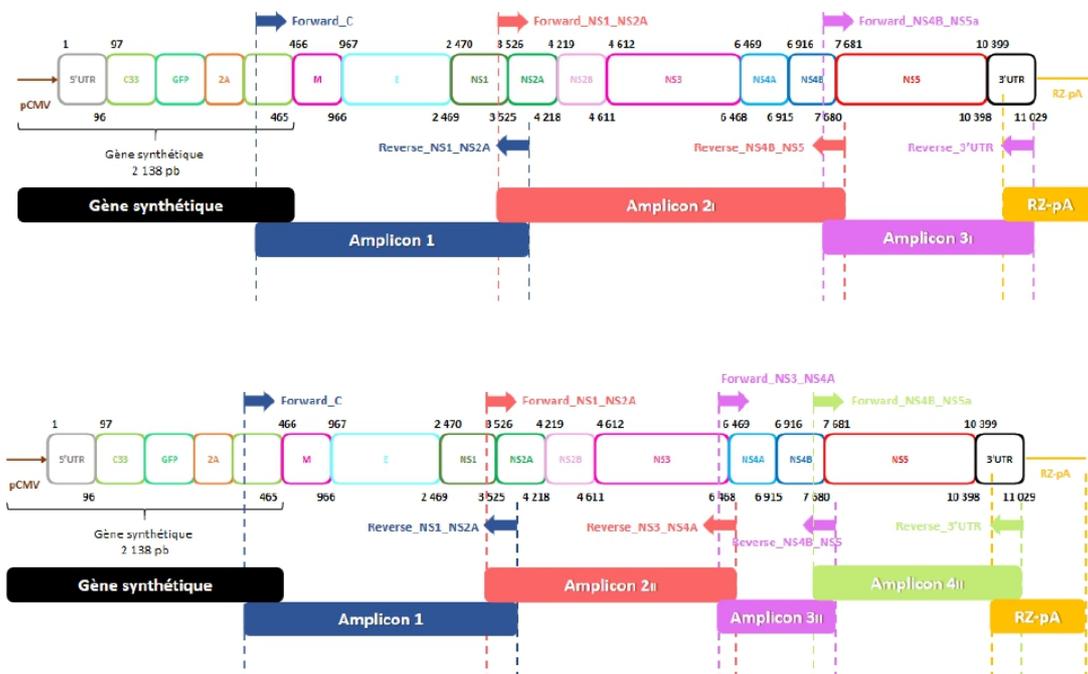


Figure III. Constructions moléculaires insérées dans des cellules permissives en méthode ISA. En utilisant le génome viral de la souche virale IS-98-ST1 comme modèle, les multiples fragments ont été créés avec des couples d'amorces de façon à ce qu'ils se chevauchent sur une centaine de bases. La fusion de tous ces fragments reformeront les génomes modifiés «pCMV-5'UTR-C33-eGFP-2A-I-II-III-3'UTR-HDR/SV40pA» et «pCMV-5'UTR-C33-mCherry-2A-I-II-III-3'UTR-HDR/SV40pA» pour la première construction et «pCMV-5'UTR-C33-eGFP-2A-I-II-III-IV-3'UTR-HDR/SV40pA» et «pCMV-5'UTR-C33-mCherry-2A-I-II-III-IV-3'UTR-HDR/SV40pA» pour la seconde. pCMV : promoteur du cytomégalo virus humain; C33 : 33 premiers acides aminés de la protéine C; GFP : marqueur de fluorescence (green fluorescence protein); 2A : protéase du virus de la fièvre aphteuse; RZ-pA ou HDR/SV40pA : ribozyme du virus de l'hépatite delta suivi du signal de polyadénylation du virus 40 simien.

Pour que la méthode ISA fonctionne, il est recommandé de transfecter entre 3 et 6 amplicons avec des séquences de taille inférieure à 4500 pb. Tous les fragments ont été amplifiés par PCR grâce au kit SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System d'Invitrogen par Thermo Fisher Scientific. Les réactions PCR se sont déroulées dans le thermocycleur (Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : une dénaturation à 98°C pendant 2 min, 35 cycles d'amplification de 98°C pendant 10 sec, 65°C pendant 10 sec, 72°C pendant 2 min et une élongation à 72°C pendant 5 min.

Le gène synthétique contenant le marqueur de fluorescence (pCMV-5'UTR-C33-mCherry-2A ou pCMV-5'UTR-C33-eGFP-2A-C) inséré dans le plasmide pUC57 a été reçu sous forme lyophilisée et suspendu dans 20 µL d'eau exempte de nucléase. La quantité d'ADN initiale a été déterminée à l'aide de l'outil Nanodrop (NanoDrop2000 par Thermo Fisher Scientific). De même, tous les couples

d'amorces sous forme lyophilisée ont été suspendus dans de l'eau exempte de nucléase en suivant la fiche fournisseur Macrogen. Deux approches moléculaires ont été envisagées pour isoler le gène synthétique de son vecteur plasmidique; la digestion enzymatique et la PCR. Dans un premier temps, le gène synthétique resuspendu a été digéré par deux enzymes de restriction NheI et XhoI dans un tampon G (Green)

Tous les fragments nécessaires à la méthode ISA (amplicons, gène synthétique, ribozyme) ont été purifiés sur colonne à l'aide du kit Purelink™ Quick PCR Purification d'Invitrogen par Thermo Fisher Scientific. Leurs tailles ont été vérifiées avant et après purification par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

Transfection de cellules permissives

En salle de culture cellulaire en laboratoire confiné de niveau 2, 2 000 000 cellules de BHK-21 et HEK-293T ont été ajoutées dans 10 mL de milieu etensemencées sous 100 µL par puits de plaques 96 puits. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Dans le laboratoire confiné de niveau 3, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X (Phosphate buffered saline) et ont été transfectées avec un mélange contenant tous les amplicons, le gène synthétique, le ribozyme et une préparation de lipofectamine et P3000 (kit Lipofectamine® 3000 transfection de Invitrogen par Thermo Fischer Scientific). Cette dernière est fondamentale pour une transfection optimale dans les cellules permissives. Le lendemain, le milieu des cellules nouvellement transfectées a été remplacé par 100 µL milieu neuf et les plaques ont été incubées à 37°C pendant six jours.

Au bout des six jours, le surnageant des cellules infectées a été récolté et passé sur des cellules Veroensemencées sous 100 µL de milieu dans une plaque de 96 puits. Trois jours plus tard, un nouveau passage du surnageant des cellules infectées a été effectué sur des cellules Vero. Après ces deux passages, 50 µL du surnageant infecté ont d'une part été à nouveau passés sur des cellules Vero et les 50 µL restants ont été collectés et congelés pour de futures analyses.

III.2. Analyse de la fluorescence *in vivo* et *in vitro*

III.2.1. Quantification d'ARN viral par RT-qPCR et qPCR

Dans un premier temps, l'ARN viral de nos constructions a été extrait de deux manières : à l'aide d'un robot extracteur Biomek 4000 Laboratory Automation Workstation par Becker Coulter grâce aux kit Nucleospin® RNA Virus Core (Macherey-Nagel) et manuellement grâce au kit Nucleospin RNA Virus de Macherey Nagel. Après extraction, les échantillons viraux ont été analysés par RT-qPCR afin de quantifier l'ARN présent grâce au kit AgPath-ID™ One-step RT-PCR de Thermo Fisher Scientific. Le processus s'est déroulé par : une étape de rétro-transcription à 45°C pendant 10 min, une

dénaturation à 95°C pendant 10 min, 45 cycles d'amplification de 95°C pendant 15 sec et une hybridation couplée à une élongation de 60°C pendant 1 min. Les résultats ont été interprétés via l'outil QuantStudio™ Design & Analysis Software.

Une PCR en temps réel (qPCR) a été effectuée afin de vérifier la nature du matériel génétique amplifié (ARN et génome viral, ADN et amplicons utilisés pour réaliser la technique ISA). Cette qPCR a été réalisée avec le kit AgPath-ID™ One-step RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) en veillant à retirer l'étape de rétro-transcription préalable à la RT-qPCR.

III.2.2. Titrage TCID₅₀

La TCID₅₀ (50% Tissue culture infectious dose) détermine la quantité de virus nécessaire pour provoquer des effets cytopathiques (ECP) dans 50% de cellules ou cultures infectées. Ainsi, 20 000 cellules Veroensemencées dans 100 µL de milieu par puits dans des plaques de 96 puits ont été inoculées avec 50 µL de dilutions en série au 1/10^{ème} de productions virales obtenues après la technique ISA. Les plaques contenaient deux colonnes de cellules témoins non infectées et huit rangées, avec une rangée pour chaque dilution, comportant chacune huit puits. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant trois jours et elles ont été analysées pour déterminer la présence ou non d'ECP par microscopie optique. Les titres infectieux, eux, ont été déterminés selon l'approche de Reed et Muench (L. J. Reed & H. Muench, 1938)

III.2.3. Test d'immunofluorescence

Une autre alternative pour étudier la dynamique d'infection du VWN a été envisagée : la détection de l'antigène NS1 du VWN par immunofluorescence indirecte. Pour se faire, 20 000 cellules Vero ont étéensemencées sur lamelle stérile dans une plaque de 24 puits coatés avec de la poly-D-Lysine (P6407-5MG, BioReagent, Sigma-Aldrich) sous 1 mL de milieu et incubées à 37°C toute la nuit. Les titres viraux ont été calculés en amont afin d'infecter les cellules avec une MOI (multiplicité d'infection) de 1, soit 1 TCID₅₀ par cellule. Ainsi, le lendemain, les cellules ont été infectées ou non avec 1 MOI de la souche IS-98-ST1 du VWN sous 3 µL dans 100 µL de DMEM pendant 1 heure 30 min à 37°C. Les cellules ont été rincées deux fois avec du DMEM complet et incubées à 37°C pendant 24 heures dans 1 mL de milieu complet. Au bout des 24 heures, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X trois fois de suite pendant 5 minutes et elles ont été fixées dans 4% de PFA (Paraformaldéhyde) - PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Une solution de méthanol froid a été ajoutée sur les cellules pendant 10 minutes sur de la glace et les cellules ont à nouveau été rincées avec du PBS 1X trois fois de suite. Les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps primaires IgM de souris (Chemicon, MAB8152) dirigés contre la protéine NS1 du VWN.

Les anticorps ont été dilués avec du 1% BSA-PBS (Bovine Serum Albumine, poudre lyophilisée par Sigma Life Science) à une concentration de 1/20 et 1/50 selon la fiche fournisseur. Les cellules non marquées par l'anticorps primaire ont été incubées avec 0,2% BSA-PBS seul. Les cellules ont été lavées avec du PBS 1X trois fois de suite et ont été fixées avec des anticorps secondaires de chèvre anti-IgM de souris couplé Texas Red (Life Technologies, SAB3701210-1MG) pendant 1 heure à l'obscurité. Les anticorps ont été dilués avec du 1% BSA-PBS à une concentration de 1/100 et 1/500 selon la fiche fournisseur. Enfin, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X et montées sur des lames de microscope avec du milieu de montage (Fluoroshield with 1,4- Diazabicyclo[2.2.2]octane de Sigma-Aldrich) pour une observation ultérieure au microscope confocal. Des témoins négatifs ont été réalisés dans la plaque de 24 puits avec : des cellules non infectées marquées (B2, B4, C2, C4) ainsi que des cellules infectées marquées uniquement avec l'anticorps secondaire (A1, B1).

III.2.4. Transparisation de la cuticule des moustiques

Les mélanines contenues dans la cuticule des moustiques sont des pigments complexes qui, via l'absorption de lumière, la rendent opaque. Ainsi, grâce aux réactifs d'éclaircissement d'organes CUBIC (Clear, Unobstructed brain/Body Imaging Cocktails)(TCI Chemicals) contenant des réactifs tels que le CUBIC-L (mélange de 10% (wt/wt) de N-butyldiéthanolamine et 10% (wt/wt) de Triton X-100) et le CUBIC-R+ (mélange de 45% d'antipyrine et de 30% nicotinamide), le processus de transparisation a pu être effectué. Les moustiques ont été récoltés après ingestion de sang ou non et immergés dans 1% de SDS (sodium dodecyl sulfate) pendant 1 heure puis fixés dans 4% de PFA dilué dans du PBS sous agitation douce à température ambiante durant toute la nuit. Les moustiques fixés ont été lavés avec du PBS 1X durant 2 heures sous agitation douce à température ambiante 3 fois de suite. Les moustiques sont immergés dans du CUBIC-L dilué au ½ pendant 6 heures à 37°C sous agitation douce. Puis le milieu a été remplacé par du CUBIC-L pur et les moustiques ont été traités pendant au moins 24 heures à 37°C sous agitation douce. Afin de stopper la réaction de délipidation, les moustiques ont été rincés dans du PBS 1X en agitant doucement pendant 2 heures et ce, trois fois de suite. Les moustiques ont été immergés dans une solution de CUBIC-R+ dilué au ½ sous agitation douce à 37°C pendant toute la nuit. Le milieu a été remplacé par du CUBIC-R+ pur et les moustiques ont été incubés à 37°C pendant au moins 24 heures. Les moustiques ont été placés dans une solution de montage afin de les observer au microscope.

III.2.5 Microscopie confocale

La microscopie confocale permet l'obtention d'images plus nettes via une observation sur plusieurs plans de l'échantillon. Le principe de la technique permet, grâce à un faisceau laser,

d'exciter les fluorochromes présents en un point de l'échantillon par émission de deux longueurs d'ondes (488nm et 532nm). Avec le logiciel Leica LAS AF (Leica Application suite advanced fluorescence) Lite 4.0 associé au microscope confocal Leica DM 2500 TCS SPE, les cellules infectées et les moustiques ont été analysés. Lors de la mise au point du logiciel, lorsque les échantillons analysés ne présentaient qu'un fluorochrome, seulement une longueur d'onde (488 ou 532 nm) a été sélectionnée. Le maximum d'unité élémentaire d'information, soit 12 bits, a été paramétré afin d'obtenir le plus de nuances de gris possible. Concernant la taille des pixels, plus ces derniers sont petits, plus l'image est nette, donc le nombre de pixels choisi s'élevait à 1024 x 1024. Pour éliminer le bruit de fond, 2 à 3 moyennages étaient effectués et l'intensité du laser était au plus faible afin que le signal ne soit pas détruit. L'objectif x 63 a été sélectionnée et une goutte d'huile pour microscope a été ajoutée sur les lamelles afin d'observer les échantillons.

III.3. Cinétique d'infection

III.3.1. Infection de moustiques par un système de gorgement in vitro

Dans l'insectarium du laboratoire confiné de niveau 2 (uniquement utilisée lors d'élevages de moustiques non infectés), avant toute utilisation, des colonies de moustiques SLAB (*Cx. quinquefasciatus*) ont été élevées toutes les semaines. En effet, 24 heures à l'avance, une génération G0 de moustique a été mise à jeun en la privant de saccharose et d'eau. Le matin de l'essai, des échantillons sanguins sur anticoagulant héparine sont prélevés sur des chèvres de l'animalerie et sont aliquotés sous 3 mL dans des tubes coatés avec de l'héparine pour empêcher la coagulation du sang. Puis 5 μ M d'ATP (Adenosine 5'-Triphosphate disodium salt hydrate, Sigma-Aldrich), soit 27,5 mg ,hémostimulant permettant d'empêcher la régurgitation du sang par les moustiques, a été ajouté dans les échantillons sanguins (10 mL). Puis environs 1,4 mL de sang a été réparti dans des membranes de cellulose contenues dans le système de gorgement artificiel et le sang a été réchauffé à 37°C. Un bac d'élevage de moustiques a été déplacé à proximité du système de gorgement et les membranes gorgées de sang ont été déposées sur ce dernier afin que les moustiques femelles puissent se nourrir. Au bout d'1 heure et 30 min, les membranes ont été enlevées du système de gorgement artificiel et des pots de papier buvard ont été imprégnés de sucrose afin de nourrir les moustiques. De plus, de l'eau dé-chlorée a été ajoutée dans le bac de moustiques afin que les femelles gorgées puissent aller pondre après leur repas sanguin (au bout d'environ 2-3 jours). Après la ponte des œufs (environ 150 par femelle), ces derniers ont été alimentés avec de la nourriture (TetraMin Flakes de Tetra) afin de stimuler leur développement jusqu'à ce qu'ils deviennent des larves. Au dernier stade larvaire (pupe), elles ont été récoltées et

introduites dans de nouveaux bacs jusqu'à leur émergence en imago afin de constituer la nouvelle génération.

Après obtention de plusieurs générations de moustiques dans le but de les gorger avec du sang infecté, les moustiques générés ont été acheminés dans le laboratoire confiné de niveau 3 dans le but de réaliser des expériences de compétence vectorielle et de les gorger avec du sang infecté. Les repas sanguins ont été prélevés et préparés de la même manière que décrite précédemment, à la différence qu'une dose précise de virus infectieux (10^7 pfu/mL) (plaque-forming unit qui représente le nombre de particules virales capables de former des plaques par unité de volume) a été ajoutée (hors contrôles négatifs).

Après gorgement des moustiques sur des membranes de cellulose remplies de sang infecté, les moustiques femelles ont été récoltées. Afin de pouvoir procéder aux dissections, les moustiques ont été soumis à du dioxyde de carbone pour les endormir. Seuls les organes d'intérêt pour l'étude ont été disséqués, à savoir le corps (pour l'infection), les pattes (pour la dissémination) et la tête, particulièrement les glandes salivaires (pour la transmission).

CHAPITRE IV : RESULTATS

IV.1. Construction de virus codant pour une protéine de fluorescence

Premièrement, le virus West Nile a été choisi comme organisme modèle afin de produire un génome génétiquement modifié. Le promoteur du cytomégalovirus humain a été inséré en amont du génome viral. Plusieurs gènes ont été insérés dans la partie 5' génomique en amont du gène codant la protéine C, la séquence des 33 premiers acides aminés de la protéine C, un marqueur de fluorescence (eGFP ou mCherry), et la protéase 2A du virus de la fièvre aphteuse (Figure 1). Le ribozyme, lui, a été intégré au niveau de l'extrémité 3' du génome viral suivi du signal de polyadénylation du virus simien 40. Les amplicons chevauchants des deux constructions ont été obtenus par PCR classique à partir du génome viral IS-98-ST1 grâce à une ADN polymérase fidèle, la SuperScript IV. Les produits PCR ont été purifiés sur colonne de silice et leurs tailles ont été vérifiées par le biais d'un gel d'électrophorèse à 1% d'agarose (Figure 1).

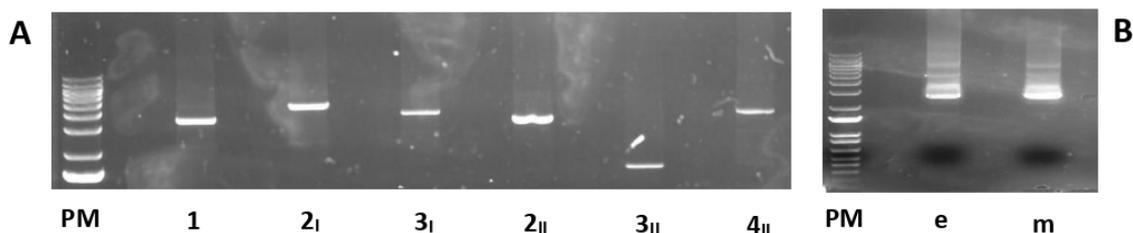


Figure 1 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR obtenus pour les fragments recombinants des deux constructions et les gènes synthétiques. Les fragments ont tous la bonne taille (gènes synthétiques : 2138pb ; amplicon 1 : 3100pb ; amplicon 2_I : 4271pb ; amplicon 3_I : 3462pb ; amplicon 2_{II} : 2997pb ; amplicon 3_{II} : 1349pb ; amplicon 4_{II} : 3562pb)

Colonnes : PM, marqueur de poids moléculaire (1 kb Plus DNA ladder) ; 1, 2_I et 3_I, amplicons de la première construction avec 5 fragments à transférer ; 1, 2_{II} à 4_{II}, amplicons de la deuxième construction avec 6 fragments à transférer ; e, marqueur fluorescent eGFP ; m, marqueur fluorescent mCherry obtenus après PCR.

IV.2. Production de virus infectieux exprimant de la fluorescence dans les cellules infectées

Afin de produire les virus modifiés et infectieux, des fragments d'ADN ont été transfectés dans des cellules BHK-21 et HEK-293T pour générer des stocks viraux. Après plusieurs passages en culture cellulaire permettant d'amplifier le titre infectieux des virus produits, la présence de virus infectieux a été analysée sur la base de quatre paramètres: (i) la présence d'effets cytopathiques (ECP) sur culture cellulaire par lecture en microscopie optique, (ii) les quantités d'ARN viral déterminées par RT-qPCR, (iii) les titres infectieux en TCID₅₀ et (iv) la détection de cellules infectées fluorescentes par imagerie de fluorescence. Nous avons pu nettement observer des ECP dans quinze puits au total au

bout de trois jours après le deuxième passage sur cellules Vero, avec apparition de cellules réfringentes à la marge des puits synonymes d'une infection par le VVN. Sur l'entièreté des transfections avec les constructions avec eGFP et mCherry, certains puits se sont avérés négatifs, matérialisés par une absence d'ECP et un tapis cellulaire sain. Pour la construction avec le marqueur eGFP, les ECP ont été observés dans presque tous les puits de la première construction (cinq fragments transfectés) avec une forte quantité de cellules réfringentes et une acidification du milieu de culture tandis que pour la construction, seuls trois des douze puits présentaient des ECP. Pour la construction avec le marqueur mCherry, les ECP ont été observés dans trois puits pour la construction 1 et quatre puits pour la construction 2 (Tableau 1).

	Marqueur eGFP		Marqueur mCherry	
	Construction 1	Construction 2	Construction 1	Construction 2
Fréquence des puits avec présence d'ECP	7/11 (63%)	3/11 (27%)	3/11 (27%)	4/11 (36%)

Tableau 1 : Caractérisation des puits positifs via l'observation d'ECP au 3ème jour après infection de cellules Vero dans nos constructions durant l'étude.

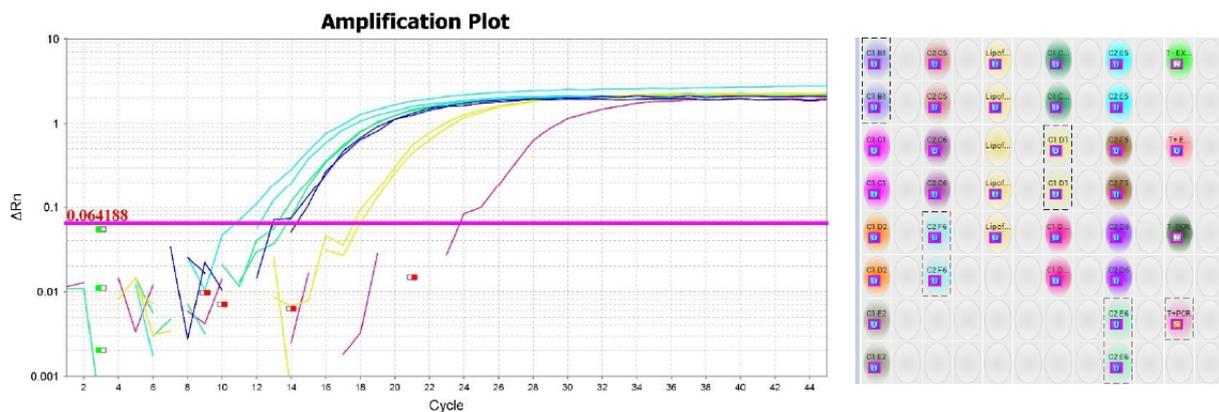


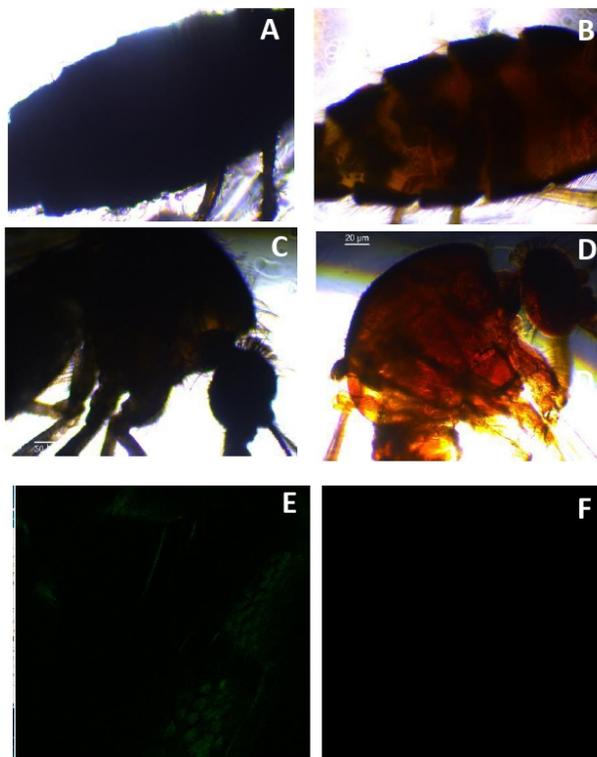
Figure 2 : Courbes d'amplification obtenues en RT-qPCR des ARN viraux en fonction du nombre de cycles PCR nécessaire pour que leur fluorescence soit détectable. On distingue 3 phases : la phase exponentielle qui démarre au niveau du threshold, la phase linéaire et la phase de plateau. Les courbes en bleu roi et bleu ciel proviennent des constructions qui ont dans leur génome le marqueur de fluorescence eGFP tandis que les courbes en jaune et vert sont issues des constructions qui possèdent dans leur génome le marqueur fluorescent mCherry.

La ligne médiane (threshold ou seuil) est le niveau de signal qui reflète une augmentation significative statistique par rapport au signal de référence calculé. La valeur du cycle seuil (Ct) est le nombre de cycle pour lequel le signal fluorescent de la réaction est supérieur au threshold.

cellules témoins non infectées et les cellules témoins infectées non marquées n'ont pas émis d'autofluorescence détectable au microscope.

IV.4. Mise au point de la transparisation du moustique *Culex*

Comme le montre la [Figure 4A](#), via l'observation en microscopie optique, le corps du moustique *Culex* est très obscur à cause de l'absorption de la lumière par l'hème contenu dans l'abdomen après un repas sanguin. Ainsi, afin d'éliminer cette absorption de lumière, des réactifs CUBIC ont été utilisés. Le traitement au CUBIC-L a permis de réduire l'obscurité des structures lipidiques contenues dans la cuticule tandis que le CUBIC-R+ a nettement augmenté la transparence du corps du moustique grâce à l'appariement des indices de réfraction ([Figure 4B, 4D](#)).



[Figure 4](#) : Éclaircissement des moustiques après ingestion de sang non infecté. (A, C) Abdomen, thorax et tête de moustiques gorgés avant traitement. (B, D) Abdomen, thorax et tête de moustiques gorgés après traitement. (E, F) Corps d'un moustique non traité et traité, respectivement. (A, B, C, D) Les moustiques ont été observés en microscopie optique et (E, F) les moustiques ont été observés au microscope confocal pour analyser l'autofluorescence naturelle des moustiques. Les barres d'échelle sont de 20 µm chacune.

De plus, alors que la tête et l'abdomen sont considérés comme des zones plus difficilement traitables, on note sur la [Figure 4D](#) qu'après traitement, ils sont tous deux nettement plus clairs. Avant d'aller plus loin dans l'étude, l'autofluorescence dégagée par le moustique a été étudiée en microscopie confocale. Comme le montre la [Figure 4E](#), il n'y a aucune fluorescence émise par le moustique traité comparativement au moustique non traité ([Figure 4E](#)) où on remarque une émission d'autofluorescence naturelle dans le canal vert.

Entre les deux constructions avec cinq et six fragments respectivement, quel que soit le marqueur de fluorescence inséré, nous n'avons pas noté de différences significatives concernant l'apparition d'ECP. Autrement dit, la nature du transgène fluorescent ou le nombre de segments transfectés n'est pas associé à une plus grande efficacité de génération de virus infectieux. Par ailleurs, la quantification des ARN viraux en RT-qPCR a permis d'objectiver une quantité suffisante d'ARN. Ici, on voit sur la [Figure 2](#) qu'il y a présence d'ARN viral associée à des Ct précoces caractéristiques d'une amplification détectée au début du cycle d'amplification.

IV.3. Suivi de l'infection virale par immunofluorescence indirecte dans les cellules infectées

Un premier essai d'immunofluorescence a permis de fixer les conditions de marquage sur cellules Vero infectées par du VWN. Sur les douze échantillons analysés, six ont été infectés par la souche virale sauvage IS-98-ST1 et les six autres n'ont pas été infectés. L'expression de la protéine virale NS1 a été détectée par immunofluorescence indirecte en utilisant un anticorps primaire dirigé contre elle ainsi qu'un anticorps secondaire IgM de chèvre anti-IgM de souris. L'anticorps primaire a été utilisé sous deux concentrations différentes : 1/20 et 1/50; tandis que l'anticorps secondaire a été dilué au 1/100 et au 1/500. Nous avons donc étudié la localisation intracellulaire de la protéine NS1 du génome du VWN après sa transcription dans les cellules infectées. L'analyse en microscopie confocale des cellules infectées a révélé une forte expression de la protéine NS1 au niveau cytoplasmique et ce, même avec une concentration d'Ac secondaire diluée au 1/500.

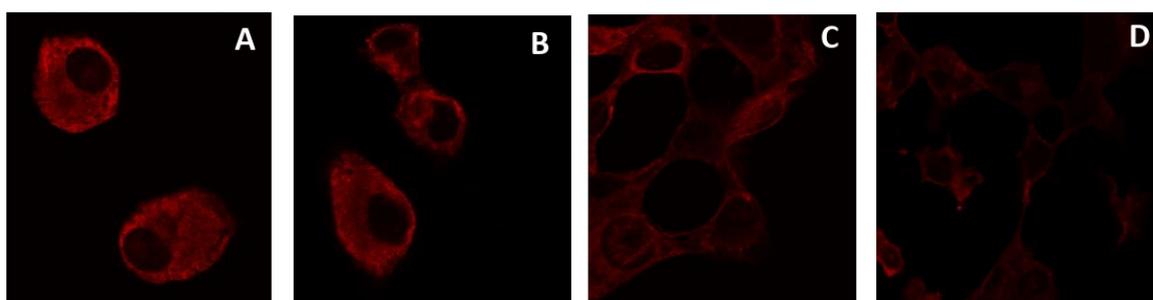


Figure 3 : Images en microscopie confocale de cellules Vero infectées (après 24 heures) par la souche virale IS-98-ST1 marquées par un anticorps primaire IgM de souris dirigé contre la protéine virale NS1. Cet anticorps primaire est lui-même reconnu par un anticorps secondaire IgM de chèvre couplé avec du Texas Red. (A, B) Cellules infectées marquées avec l'Ac primaire dilué au 1/20 et l'Ac secondaire dilué au 1/500 (x 63). (C, D) Cellules infectées marquées avec l'Ac primaire dilué au 1/20 et l'Ac secondaire dilué au 1/100 (x 63). Les

CHAPITRE V : DISCUSSION

Le premier objectif de cette étude était d'élaborer un arbovirus modifié possédant un marqueur de fluorescence via un outil de génétique inverse afin que la transcription virale puisse être suivie dans les cellules infectées. Notre modèle d'étude étant le virus West Nile, nous avons produit deux constructions intégrant le fluorochrome eGFP ou mCherry avec un nombre différent de fragments chevauchants pour la transfection cellulaire. Le développement de méthodes moléculaires permettant la production de virus infectieux à partir de copies de matériel génétique a amélioré les connaissances de la biologie et de la pathogenèse des virus à ARN (F. Aubry *et al*, 2015). Depuis les années 80s, pléthores d'études ont été réalisées afin de remplacer les techniques imprévisibles et laborieuses générant des clones infectieux instables (C. M. Rice *et al*, 1989) requérant des approches s'affranchissant de l'utilisation de bactéries. En effet, certaines améliorations méthodologiques telles que l'utilisation de plasmides, de vecteurs cosmides, de chromosomes artificiels bactériens (YAC) ont été proposées (T. S. Gritsun & E. A. Gould, 1998).

Il est important de prendre en compte le nombre ainsi que la taille des fragments à transférer afin de reproduire le génome viral modifié initial. Ceci permet à long terme de tester la robustesse, la flexibilité et la versatilité de la méthode ISA. Plusieurs études ont cherché à optimiser la méthode ISA, en recherchant la combinaison de fragments la plus efficace (nombre de fragments à transférer, taille des fragments). Comme l'indique T. Atieh *et al* en 2018, habituellement le nombre de fragments chevauchants pouvant être transfectés s'élève à trois en tenant compte du fragment incluant le pCMV, de la séquence protéique et du fragment contenant le ribozyme suivi du signal de polyadénylation. Il est démontré que l'obtention des fragments terminaux en 5' et 3' est un processus qui peut s'avérer ardue et longue d'où l'alternative de produire plus de fragments en veillant à créer des amplicons séparés du pCMV et du HDR/SV40pA. Ici, nous avons fait le choix de procéder à deux constructions avec un nombre différent de fragments pour comparer le nombre idéal d'amplicons à transférer. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à mettre en exergue l'avantage d'insérer cinq fragments plutôt que six. Un autre paramètre à prendre en compte dans la production des fragments utilisés pour la méthode ISA est leur taille.

Une première tentative de la méthode ISA a été réalisée après obtention du premier fragment par digestion enzymatique d'un gène synthétique et n'a pas permis de générer de virus infectieux; l'efficacité de l'approche ISA (approche par recombinaison entre fragments chevauchants d'ADN permettant de couvrir l'intégralité du génome viral) est fortement dépendante de la qualité et de la quantité de l'ADN. Ces deux conditions n'ont pas pu être réunies après digestion enzymatique du gène synthétique (fragment 1) (quantité d'ADN faible en partie due une incompatibilité partielle de tampons pour les deux enzymes de restriction utilisées (XhoI et NheI), provoquant ainsi une

diminution de leur activité enzymatique). De plus, le protocole d'extraction du fragment d'intérêt (gène synthétique) du vecteur plasmidique après digestion enzymatique n'était pas optimisé. La deuxième approche visant à amplifier le fragment d'intérêt dans le plasmide directement par l'utilisation d'amorces spécifiques a été accomplie avec succès.

La réplication virale après approche ISA et plusieurs passages sur cellules a été démontrée pour une variété de virus à ARN (virus de l'encéphalite à tiques, virus de la fièvre jaune entre autres) grâce à l'étude de critères spécifiques : (i) la production de génomes viraux dans le surnageant des cellules infectées grâce à la RT-qPCR, (ii) la quantification de particules infectieuses en utilisant une méthode de titrage TCID₅₀, (iii) la détection d'effets cytopathiques (ECP) et (iv) la mise en évidence d'antigènes viraux par imagerie de fluorescence (F. Aubry *et al*, 2015). Par ailleurs, il faut noter qu'un nombre élevé de passages (environ quatre) effectué pour les virus produits assure une élimination efficace des amplicons d'ADN utilisés durant la transfection (F. Aubry *et al*, 2015). Comme nous nous y attendions, concernant les ECP, ils ont toujours été retrouvés dans les cultures cellulaires positives et ce, depuis le premier passage sur cellules Vero. Ce fait confirme la production de virus infectieux avec des quantités d'ARN viraux détectables en TCID₅₀ (T. Atieh *et al*, 2018). De plus, nous avons pu corrélérer ces résultats en analysant la quantité de génomes viraux sécrétés dans le surnageant des cellules infectées par RT-qPCR. Les courbes d'amplification virale obtenues en RT-qPCR (Figure 2) mettent l'accent sur la détection d'ARN viral pour nos constructions avec des Ct très précoces (entre 15 et 21 cycles). Pour confirmer cela, une qPCR a été réalisée en parallèle afin de s'affranchir de la quantification d'ADN double brin issus des amplicons transfectés qui pourraient émettre des signaux de fluorescence et s'assurer que l'ARN viral est bien visualisé.

Par ailleurs, de multiples études mettent en évidence l'utilisation des cellules Vero pour l'amplification virale (S. Kiesslich & A. A. Kamen, 2020). Les cellules Vero sont très sensibles à plusieurs virus dû en partie au fait d'un défaut de signalisation de la réponse interféron. Les cellules sont alors incapables de synthétiser les interférons de type I en cas d'infection virale entraînant une altération des mécanismes de défenses antivirales (J. M. Emeny & M. J. Morgan, 1979). Ce type cellulaire est donc considéré comme un modèle robuste et fiable pour la production efficace de virus. Dans notre étude, le vecteur transmettant le VWN est le moustique; ce pourquoi un autre aspect fondamental à analyser est l'amplification sur cellules de moustiques (C6/36 d'*Aedes albopictus* en particulier). Cette lignée cellulaire générée à partir de larves par K. R. P. Singh en 1967, a été largement utilisée pour étudier les interactions entre les arbovirus et les moustiques vecteurs. Des études ont mis en exergue la sensibilité des cellules C6/36 vis-à-vis d'un panel d'arbovirus, associée à une déficience de la réponse fonctionnelle de la voie des ARN interférents (ARNi) (T. Walker *et al*, 2014; D. E. Brackney *et al*, 2010). Comme R. Fujita *et al* en 2018 l'ont parfaitement

démonstré, le VWN infecte de façon persistante des cultures de lignées cellulaires de C6/36 et a pu être isolé.

Dans une étude de T. Atieh *et al* en 2016, après qu'ils aient comparé une souche de flavivirus (Zika, ZIKV provenant de Polynésie française) recombinant *in cellulo* avec la souche virale parentale, la cinétique de réplication virale a été caractérisée. Aussi ont-ils remarqué que la cinétique de réplication des virus recombinant et parental était essentiellement similaire. En partant de l'hypothèse validée de J. Yin & J. Redovich en 2018, il est clair que la dynamique de la réplication virale intracellulaire est régie par les taux de transcription virale, de réplication génomique et de synthèse protéique. Dans notre étude, après avoir réalisé nos constructions, il fallait vérifier le fait qu'elles se comportent comme des virus parentaux. Pour cela, nous allons caractériser *in vitro* les virus parentaux (IS-98-ST1) et nos virus modifiés via une cinétique d'infection sur cellules Vero et sur cellules C6/36 de moustiques *Aedes* (potentiellement vecteur du VWN) qui est en cours. Afin de caractériser les propriétés de croissance et d'infection du virus, les cellules devaient être infectées avec la souche virale sauvage et le virus modifié aux mêmes MOI. Z-R. Zhang *et al* en 2020 ont montré que la courbe de croissance virale du génome viral modifié avec un marqueur de fluorescence, la eGFP, était similaire à celle du virus sauvage WT-JEV (virus de l'encéphalite japonaise) et que la réplication du génome viral modifié pourrait être aisément suivie grâce aux signaux émis par la eGFP. Il est souhaitable de réaliser ce type d'essai afin de s'assurer que l'insertion du transgène ne modifie pas le comportement du virus modifié.

Un enjeu fondamental de cette étude était la stabilité génétique de notre génome viral modifié. En effet, les insertions de gènes n'ont pas été faites au hasard mais choisies méticuleusement selon les données de la littérature. Plusieurs sites d'insertion géniques ont déjà été étudiés, en particulier celles qui confèrent une stabilité du génome : au sein de la protéine C et en aval de la polyprotéine. Pour commencer, le promoteur du cytomégalo virus humain (pCMV) a été ajouté en amont du premier fragment afin d'initier la transcription d'ADN en ARN via une ARN polymérase dépendante d'ADN après transfection. D'autre part, le promoteur pCMV est connu pour permettre la production d'ARN viral *in cellulo* après transfection directe de fragments d'ADNc dans les cellules eucaryotes (F.Aubry *et al*, 2015). Le ribozyme HDR/SV40pA, lui, a pour but de faciliter la fin de la transcription avec la maturation, l'épissage et la polyadénylation de l'ARN à l'origine de la production de particules virales infectieuses. Zou *et al* en 2011 et Schoggins *et al* en 2012 ont obtenu avec succès un virus de la dengue codant pour gène de *Renilla* luciférase en insérant les 38 ou 25 premiers acides aminés de la protéine C (permettant de conserver les éléments nécessaires pour la cyclisation génomique) respectivement. Ils ont également constaté que l'insertion de la séquence du virus de la fièvre aphteuse 2A a permis la maturation de la protéine de fluorescence. Sur le même modèle, nous

avons choisi d'intégrer les 33 premiers acides aminés de la protéine C en amont du gène de fluorescence. Pour finir, X-F. Li *et al* en 2017 ont mis en évidence une mutation M16T dans la protéine C située au niveau d'une séquence 5'CS qui faciliterait la cyclisation du génome. ; ce qui a permis de démontrer que cette mutation contribue à la stabilité des flavivirus recombinants. Comme le montre la [Figure 1](#), par le biais du clivage par le peptide 2A, la protéine de fluorescence est relarguée dans le cytoplasme au sein des cellules infectées et visible en imagerie de fluorescence. Ainsi, le niveau d'expression du marqueur de fluorescence est corrélé avec le taux de transcription du virus. Par ailleurs plusieurs études relatent de ce fait; M. R. Soboleski *et al* en 2005 indiquent que la fluorescence émise par la GFP (Green fluorescent protein) varie proportionnellement à l'abondance d'ARNm contenant le gène GFP dans des cellules Vero. Ainsi, la précision, la portée, la sensibilité, la reproductibilité entre autres, d'un marqueur de fluorescence, surtout de la GFP, en font un outil de choix pour étudier l'expression de la fluorescence dans les cellules infectées. De plus, l'analyse de la stabilité de la construction virale produite doit rentrer en compte dans le processus. Afin d'étudier la stabilité génétique, les constructions contenant les marqueurs de fluorescence pourraient subir plusieurs passages sur cellules C6/36 étant donné que cette stabilité est cruciale pour la reproductibilité et la fiabilité de l'essai. Comme l'ont prouvé, Z-R. Zhang *et al* en 2020, le gène codant pour le fluorochrome eGFP était stable dans le virus de l'encéphalite japonaise au bout de quatre passages en série. La dernière étape dans la vérification de la production du génome viral modifié se fait par un séquençage haut débit pour comparer les similarités de séquences avec le virus parental. Pour se faire, il serait envisageable de procéder à un séquençage du génome complet par Ion Torrent qui est une approche SISPA (Sequence- Independent, Single-Primer-Amplification) maîtrisée au laboratoire. Une étude a démontré l'efficacité de la caractérisation de génomes viraux par la SISPA avec plus de 99% d'identités (A. Brinkmann *et al*, 2021). Cependant, une limite peut survenir en utilisant cette approche : il peut y avoir un risque accru d'insertion de mutations dans les fragments même avec l'utilisation d'une enzyme ultrafidèle. Afin de pallier au risque de ne pas obtenir de virus infectieux contenant un génome modifié, une infection virale cellulaire avec la souche IS-98-STI sauvage a été envisagée. Dans le but de suivre cette infection à travers la cellule, il était question de mettre en place un test d'immunofluorescence indirecte. Il est important de noter que de multiples paramètres doivent être pris en compte pour s'assurer du succès de la manipulation : la fixation, la perméabilisation et la détermination de la spécificité du marquage (J. G. Donaldson, 2015). Lors du premier essai sur cellules Vero, la mise au point de cet essai de marquage de NS1 nous permettra de comparer la sensibilité de la détection des antigènes viraux après expression directe du fluorochrome à partir des virus génétiquement modifiés ou après immunomarquage.

Le second aspect de cette étude concernait la mise au point d'une technique de transparençation de la cuticule des moustiques afin de visualiser la dissémination du virus à travers le vecteur. Dans un premier temps, il est important de noter que l'efficacité de la réplication des arbovirus au sein des moustiques vecteurs a un fort impact sur les mécanismes de la transmission virale. Peu d'études sont disponibles sur les moustiques à cause de leur courte durée de vie qui rend les expérimentations ardues et complexes. De ce fait, l'étude des processus de dissémination lors d'une infection virale persistante *in vivo* peut s'avérer laborieuse (J. M. Reyes-Ruiz *et al*, 2019). Les méthodes actuelles sont presque limitées à l'observation visant à confirmer la présence ou l'absence d'agents pathogènes dans les organes de moustiques isolés, comme l'intestin moyen. Récemment, plusieurs études ont achevé avec succès l'analyse des structures internes cellulaires et moléculaires dans les tissus multicellulaires des mammifères, en utilisant des technologies de transparençation de tissus (Tian *et al*, 2020). En 2019, une étude a accompli avec succès un éclairçissement des structures internes et externes de moustiques afin de suivre l'infection parasitaire par *Plasmodium berghei*, responsable de la malaria (T. Mori *et al*, 2019). J'ai choisi d'appliquer une technique de transparençation qui avait donné des résultats prometteurs chez des moustiques *Anopheles* et qui a été optimisée pour autoriser une transparençation efficace d'une large variété d'organes et de tissus de vertébrés (De Niz *et al*, 2020; Smolla *et al*, 2014). En effet, l'utilisation de réactifs CUBIC, technologie composée d'urée et de détergents qui serait à l'origine d'une élimination efficace de la dispersion de lumière émise par les lipides (K. Tainaka *et al*, 2018). Par ailleurs, d'autres techniques de transparençation de moustiques auraient pu être envisagées, notamment la méthode BABB (Benzyl Alcohol Benzyl Benzoate) qui possède un indice de réfraction semblable au tissu fixé lui permettant d'éclairçir efficacement les échantillons (E. A. Susaki *et al*, 2015). Cependant même si le BABB pouvait transparençer efficacement et pleinement les tissus de moustiques, ce protocole dégradait les signaux de GFP rapidement. D'autres outils de transparençation peuvent être envisagés à base de solvants (3DISCO), d'eau (SeeDB) et d'enrobage par hydrogel (T. Ting *et al*, 2021).

Au-delà de la mise au point sur l'organisme du moustique, nous devons également développer des méthodes analytiques de suivi de l'infection virale au sein même du vecteur. Historiquement, l'étude de l'infection, de la réplication, de la dissémination, du tropisme et de la transmission intravectérielle reposait majoritairement sur la détection des antigènes et l'analyse structurale pour identifier les régions ou tissus importants pour la réplication virale. Ainsi, le principal avantage de l'expression de fluorescence est qu'elle permet d'identifier facilement les régions de réplication et de suivre la progression de l'infection dans les tissus vivants. La technologie de génétique inverse, en particulier la capacité d'exprimer un marqueur visible à partir d'un génome viral recombinant, offre une excellente alternative pour le suivi dynamique de l'infection *in vivo* (C. E. McGee *et al*, 2010). Le

suivi de fluorescence sur moustique entier permettra d'optimiser les expériences de compétence vectorielle réalisées en laboratoire, en permettant d'acquérir plus rapidement la cinétique d'infection des moustiques (contre des techniques moléculaires ou d'isolement viral, qui ne peuvent concerner que des tissus/organes spécifiques de moustique), cela souligne le ciblage de tissus ou de temps post-infection.

Certaines difficultés techniques sont survenues durant notre étude qui n'avaient jusqu'ici pas été reportées. En effet, pendant le processus de transparisation, les cuticules de certains moustiques ont éclaté dû à l'hydrophobicité de la cuticule. Par ailleurs, lors du processus de fixation, les moustiques n'ont pas été totalement en immersion dans le paraformaldéhyde (PFA), formant une bulle d'air autour des moustiques. De plus, on peut avancer le fait que le protocole initial de transparisation sur moustiques non gorgés n'a pas été optimisé pour les moustiques gorgés après leur repas sanguin. Pour parer à cette difficulté, les moustiques ont été placés dans une solution de 1% de sodium dodecyl sulfate (SDS) dilué dans du PBS pendant 1 heure avant tout processus de fixation. Après perméabilisation des structures des moustiques par le détergent, nous avons pu remarquer une immersion totale des insectes dans la solution de fixation PFA. Comme l'ont expérimenté J. Juhn & A. A. James en 2012, il est important de laisser les tissus se déposer au fond du récipient afin que toutes les solutions ajoutées ultérieurement puissent être efficaces et que la perte d'échantillons soit minimisée. L'observation des moustiques fixés et transparisés en microscopie confocale (et à épifluorescence, le cas échéant) était un outil phare dans cette étude afin d'analyser les cellules ou tissus de moustiques après marquage par des fluorochromes. Cependant, les caractéristiques du microscope telles que l'objectif, le moyennage, la taille du diaphragme, la source d'excitation du laser entre autres influent la qualité des images acquises (R.M. Zucker, 2006).

D'autres techniques de suivi d'infection chez le moustique pourrait être envisagées : l'imagerie par bioluminescence (IBL) par exemple. Certaines études ont prouvé que la BLI est un outil puissant pour l'étude de la pathogenèse virales et bactériennes dans des modèles animaux (X-F. Li *et al*, 2017). Des chercheurs de l'université du Colorado ont accompli avec succès la visualisation de virus au sein des cellules hôte grâce à l'utilisation de biocapteurs qui s'allument en différentes couleurs en fonction de l'ORF traduit lors de l'infection virale (Koch *et al*, 2020).

Les protéines de fluorescence offrent une approche intéressante pour marquer les tissus, car elles sont très sensibles même à de faibles concentrations, stables sur de longues périodes et n'interfèrent pas avec la fonction des molécules cibles (C. P. Toseland, 2013). Ainsi, après la transparisation des moustiques dans les réactifs CUBIC, il s'agira de les infecter afin de suivre la fluorescence à différents temps après infection.

Cette étude a permis de souligner la pertinence de l'utilisation de virus codant pour des protéines de fluorescence afin de mieux comprendre les mécanismes qui permettent la pathogenèse virale dans l'organisme hôte. Il est crucial de différencier et de comparer les processus provoqués par les virus parentaux de ceux engendrés par les virus recombinants. En poussant l'étude plus loin, en utilisant plusieurs espèces de moustiques de terrains, il serait intéressant de les infecter avec les mêmes constructions virales modifiées pour comparer et visualiser le tropisme viral de vecteurs. Ainsi, d'une part cette approche pourrait mettre en évidence d'autres espèces de moustiques, autre que le *Cx. quinquefasciatus*, endémiques de Guadeloupe qui transmettent efficacement le virus, mais également de déterminer les taux de dissémination virale dans les organes cibles en fonction de l'espèce. Un autre abord de l'étude consisterait à intégrer d'autres mutations (au niveau d'un nucléotide ou d'un acide aminé) dans les génomes viraux modifiés et analyser leurs impacts sur le tropisme viral.

CHAPITRE VI : CONCLUSION

En conclusion, j'ai développé avec succès un génome viral à ARN génétiquement modifié par génétique inverse. Ainsi, la méthode ISA est une procédure relativement simple et rapide à effectuer dans le but de produire des virus infectieux en très peu de temps avec un contrôle des séquences virales.

En parallèle, j'ai pu visualiser par immunofluorescence indirecte l'infection par la souche virale IS-98-ST1 du VWN dans des cellules Vero en microscopie confocale.

De plus, je suis parvenue à mettre au point une technique de transparisation de la cuticule des moustiques afin d'analyser la dissémination virale à travers le moustique transparisé par imagerie de fluorescence. Comme les méthodes de transparisation antérieures basées sur des tissus transparents et des marqueurs fluorescents ont permis d'observer les comportements cellulaires entiers et individuels dans un tissu, il est possible que je puisse plus facilement visualiser la fluorescence à travers l'organisme du moustique.

Le virus West Nile (VWN) ou virus du Nil Occidental (VNO), principal agent responsable d'encéphalite virale, est un arbovirus qui appartient au genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. Il est maintenu dans un cycle enzootique entre les oiseaux et les moustiques du genre *Culex* plus particulièrement. La dissémination du VWN au sein des moustiques vecteurs est encore actuellement mal connue et est un sujet d'intérêt pour la communauté scientifique. Il devient capital d'analyser et de suivre les mécanismes et les déterminants à l'origine de la propagation virale dans le vecteur. Dans cette étude, j'ai élaboré des constructions virales génétiquement modifiées fluorescentes en insérant un gène codant pour une protéine de fluorescence dans la région N-terminale du génome viral. En parallèle, j'ai mis au point une technique de transparasitisme de la cuticule de moustiques afin de visualiser de façon optimale la dissémination du VWN au sein du vecteur par imagerie de fluorescence. J'ai ainsi obtenu des virus infectieux génétiquement modifiés (insertion d'un transgène fluorescent GFP ou mCherry) par transfection de fragments d'ADN recombinants et chevauchants issus du génome viral ou de gène synthétique dans des cellules permissives BHK-21 et HEK-293T. Les approches développées me permettront de suivre l'infection virale chez le moustique entier.

Mots-clés :

West Nile Virus, moustiques, *Culex quinquefasciatus*, génétique inverse, virus modifiés

The West Nile virus (VWN) or West Nile virus (WNV), the main cause of viral encephalitis, is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae*. It is maintained in an enzootic cycle between birds and mosquitoes of the genus *Culex* more particularly. The spread of VWN within mosquito vectors is still poorly known and is of interest to the scientific community. It becomes crucial to analyze and track the mechanisms and determinants behind viral spread in the vector. In this study, I developed genetically modified fluorescent viral constructions by inserting a gene encoding a fluorescence protein into the N-terminal region of the viral genome. In parallel, I developed a technique for transparizing the cuticle of mosquitoes in order to optimally visualize the spread of VWN within the vector by fluorescence imaging. I obtained genetically modified infectious viruses (insertion of a fluorescent GFP or mCherry transgene) by transfecting recombinant and overlapping DNA fragments from the viral genome or synthetic gene into permissive BHK-21 and HEK-293T cells. The approaches developed will allow me to track viral infection in the whole mosquito.

Keywords:

West Nile Virus, mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*, reverse genetics, modified viruses

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aliota, M. T. & Kramer, L. D. « Replication of West Nile virus, Rabensburg lineage in mammalian cells is restricted by temperature ». *Parasites & Vectors* **5**, 293 (2012).
2. Atieh, T., El Ayoubi, M. D., Aubry, F., Priet, S., de Lamballerie, X., & Nougairède, A. (2018). « Haiku: New paradigm for the reverse genetics of emerging RNA viruses ». *PLoS one*, *13*(2), e0193069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193069>
3. Aubry, F., Nougairède, A., Gould, E. A. & de Lamballerie, X. « Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: A historical perspective ». *Antiviral Research* **114**, 67–85 (2015).
4. Aubry, F., Nougairède, A., De fabritus L., Querat, G., Gould, E. « Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons ». *J Gen Virol* **95**, 2462–2467 (2014).
5. Beasley, D. W. C., Whiteman, M.C., Zhang, S., Huang, C.Y.-H., Schneider, B.S. *et al.* « Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains ». *J Virol* **79**, 8339–8347 (2005).
6. Bialosuknia, S. M., Tan, Y., Zink, S. D., Koetzner, C. A., Maffei, J.G., Halpin, R. A., Muller, E., Novatny, M., Shilts, M., Fedorova, N. B., Amedeo, P., Das, S. R., Pickett, B., Kramer, L. D., & Ciota, A. T. « Evolutionary dynamics and molecular epidemiology of West Nile virus in New York State: 1999–2015 ». *Virus Evol* **5**, vez020 (2019).
7. Brinkmann, A. *et al.* « Utility of a Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) and Nanopore Sequencing Approach for Detection and Characterization of Tick-Borne Viral Pathogens ». *Viruses* **13**, 203 (2021).
8. Brinton, M. A. « Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus ». *Viruses* **6**, 13–53 (2013).
9. Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E. & Rios, M. « The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus ». *BioMed Research International* **2015**, e376230 (2015).
10. Charrel, R. N., Brault, A.C., Gallian, P., Lemasson, J.-J., Murgue, B. *et al.* « Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains: Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe ». *Virology* **315**, 381–388 (2003).
11. Cho, H. & Diamond, M. S. « Immune Responses to West Nile Virus Infection in the Central Nervous System ». *Viruses* **4**, 3812–3830 (2012).
12. Ciota, A. T. & Kramer, L. D. « Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus ». *Viruses* **5**, 3021–3047 (2013).
13. Combs, C. A. « Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods ». *Curr Protoc Neurosci* **0 2**, Unit2.1 (2010).

14. De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M. S. & Sanders, N. N. « Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination ». *Veterinary Research* **43**, 16 (2012).
15. Driouich, J.-S., Moureau, G., de Lamballerie, X. & Nougairède, A. « Reverse Genetics of RNA Viruses: ISA-Based Approach to Control Viral Population Diversity without Modifying Virus Phenotype ». *Viruses* **11**, 666 (2019).
16. Driouich, J.-S., Mohamed Ali, S., Amroun, A., Aubry, F., Lamballerie, X, Nougairède, A.. « SuPREMe: a rapid reverse genetics method to generate clonal populations of recombinant RNA viruses ». *Emerging microbes & infections* **7**, 40 (2018).
17. Eastwood, G., Kramer, L. D., Goodman, S. J. & Cunningham, A. A. « West Nile Virus Vector Competency of *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes in the Galápagos Islands ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **85**, 426–433 (2011).
18. Fiacre, L., Pagès, N., Albina, E., Richardson, J., Lecollinet, S., Gonzalez, G.. « Molecular Determinants of West Nile Virus Virulence and Pathogenesis in Vertebrate and Invertebrate Hosts ». *Int J Mol Sci* **21**, 9117 (2020).
19. Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. & Gelbart, W. M. « Reverse genetics ». *An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition* (2000).
20. Habarugira, G., Suen, W. W., Hobson-Peters, J., Hall, R. A. & Bielefeldt-Ohmann, H. « West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications ». *Pathogens* **9**, 589 (2020).
21. Hayes, E. B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S. P., O’Leary, D. R. & Campbell, G. B. « Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease ». *Emerg Infect Dis* **11**, 1167–1173 (2005).
22. Hubálek, Z. & Halouzka, J. « West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe ». *Emerg Infect Dis* **5**, 643–650 (1999).
23. Kampen, H., Holicki, C. M., Ziegler, U. Groschup, M. H., Tews, B. A., Werner & D.. « West Nile Virus Mosquito Vectors (Diptera: Culicidae) in Germany ». *Viruses* **12**, 493 (2020).
24. Koch, A., Aguilera, L., Morisaki, T., Munsy, B. & Stasevich, T. J. « Quantifying the spatiotemporal dynamics of IRES versus Cap translation with single-molecule resolution in living cells». 2020.01.09.900829 (2020) doi:10.1101/2020.01.09.900829.
25. Komar, N. & Clark, G. G. « West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean ». *Rev Panam Salud Publica* **6** (2006).
26. Lanteri, M. C., Assal, A., Norris, P. J. & Busch, M. P. « Le virus West Nile - I. La conquête de l’Ouest ». *Med Sci (Paris)* **27**, 375–381 (2011).
27. Lefrançois, T., Blitvich, B., Pradel, J., Molia, S., Vachiéry, N., Martinez, D.. « West Nile Virus in Guadeloupe ». *Annals of the New York Academy of Sciences* **1081**, 206–15 (2006).
28. Li, X.-F. *et al.* « Visualization of a neurotropic flavivirus infection in mouse reveals unique viscerotropism controlled by host type I interferon signaling ». *Theranostics* **7**, 912–925 (2017).

29. Li, Z., Zhang, J. & Li, H. « Flavivirus NS2B/NS3 Protease: Structure, Function, and Inhibition ». *Viral Proteases and Their Inhibitors* 163–188 (Elsevier, 2017). doi:[10.1016/B978-0-12-809712-0.00007-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809712-0.00007-1).
30. Liu, W. J., Chen, H. B. & Khromykh, A. A. « Molecular and Functional Analyses of Kunjin Virus Infectious cDNA Clones Demonstrate the Essential Roles for NS2A in Virus Assembly and for a Nonconservative Residue in NS3 in RNA Replication ». *J Virol* **77**, 7804–7813 (2003).
31. Lucas M, Frenkiel MP, Mashimo T, Guénet JL, Deubel V, Desprès P, Ceccaldi PE. « The Israeli strain IS-98-ST1 of West Nile virus as viral model for West Nile encephalitis in the Old World ». *Virology*. 2004 Nov **18**;1:9. doi: 10.1186/1743-422X-1-9.
32. Ludwig, G. V., Calle, P.P., Mangiafico, J.A, Raphael, B.L., Danner, D.K., Hile, J.A., Clippinger, T.L., Smith, J.F., Cook, R.A. & McNamara T. « An outbreak of West Nile virus in a New York City captive wildlife population ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **67**, 67–75 (2002).
33. Lvov, D. K., Butenko, A.M., Gromashevsky, V.L., Kovtunov, A.I., Prilipov, A.G. *et al*, « West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations ». *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides* (eds. Calisher, C. H. & Griffin, D. E.) 85–96 (Springer, 2004). doi:[10.1007/978-3-7091-0572-6_7](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0572-6_7).
34. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K. & Westaway, E. G. « Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A ». *Virology* **245**, 203–215 (1998).
35. McGee, C. E., Shustov, A. V., Tsetsarkin, K., Frolov, I. V, Mason, P. W., Vanlandingham, D. & Diggs, S. « Infection, Dissemination, and Transmission of a West Nile Virus Green Fluorescent Protein Infectious Clone by *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquitoes ». *Vector Borne Zoonotic Dis* **10**, 267–274 (2010).
36. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S. & Bartenschlager, R. « The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner* ». *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8873–8882 (2007).
37. Mori, T., Hirai, M. & Mita, T. « See-through observation of malaria parasite behaviors in the mosquito vector ». *Sci Rep* **9**, 1768 (2019).
38. Muller, D. A. & Young, P. R. « The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker ». *Antiviral Research* **98**, 192–208 (2013).
39. Murgue, B., Murri, S., Triki, H., Deubel, V. & Zeller, H. G. « West Nile in the Mediterranean Basin: 1950-2000 ». *Annals of the New York Academy of Sciences* **951**, 117–126 (2001).
40. Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O’Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., Wong, S. & Layton, M. «The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999 ». *N Engl J Med* **344**, 1807–1814 (2001).
41. Niz, M., Kehrler, J., Brancucci, N., Moalli, F. Reynaud, E., Stein, J. & Frischknecht, F. « 3D imaging of undissected optically cleared *Anopheles stephensi* mosquitoes and midguts infected with *Plasmodium* parasites ». *PloS one* **15**, e0238134 (2020)

42. Pachler, K., Lebl, K., Bere, D., Rudolf, I., Hubalek, Z. & Nowotny, N. « Putative New West Nile Virus Lineage in *Uranotaenia unguiculata* Mosquitoes, Austria, 2013 ». *Emerging Infectious Diseases journal* **20**(12), 2119-2122 (2014). doi:[10.3201/eid2012.140921](https://doi.org/10.3201/eid2012.140921).
43. Pages N., Vachiery N., Lefrançois T., Albina E., Giraud-Girard K. & Pradel J. « West Nile virus surveillance in Guadeloupe, French West Indies. », in International SOVE Congress. New technology conquering old vectors?, eds. M. Chueca, M. Á. Alten Bulent (Palma de Mallorca, Spain), 84.
44. Pierson, T. C., Diamond, M.S., Ahmed, A.A., Valentine, L.E., Davis, C.W., Samuel, M.A., Hanna, S.L., Puffer, B.A. & Doms, R.W. « An infectious West Nile Virus that expresses a GFP reporter gene ». *Virology* **334**, 28–40 (2005).
45. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. « The continued threat of emerging flaviviruses ». *Nat Microbiol* **5**, 796–812 (2020).
46. Pradel, J., Chalvet, M.K., Molia, S., Vachiéry, N., Rousteau, A., Imbert, D., Martinez, D., Sabatier, P. & Lefrançois, T. « Risk factors for West Nile virus seropositivity of equids in Guadeloupe ». *Preventive Veterinary Medicine* **92**, 71–78 (2009).
47. Quirin, R., Salas, M., Zientara, S., Zeller, H., Labie, J., Murri, S., Lefrançois, T., Petitclerc, M. & Martinez, D. « West Nile Virus, Guadeloupe ». *Emerg Infect Dis* **10**, 706–708 (2004).
48. Rappole, J. H., Derrickson, S. R. & Hubálek, Z. « Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere ». *Emerg Infect Dis* **6**, 319–328 (2000).
49. Reed, L. J. & Muench, H. « A simple method of estimating fifty per cent endpoints ». *American Journal of Epidemiology* **27**, 493–497 (1938).
50. Rice, C. M., Grakoui, A., Galler, R. & Chambers, T. J. « Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation ». *New Biol* **1**, 285–296 (1989).
51. Rossini, G., Landini, M. P., Gelsomino, F., Sambri, V. & Varani, S. « Innate host responses to West Nile virus: Implications for central nervous system immunopathology ». *World J Virol* **2**, 49–56 (2013).
52. Sejvar, J. J. « West Nile Virus Infection ». *Microbiol Spectr* **4**, (2016).
53. Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W. & Paul, J. H. « A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda ». *American Journal of Tropical Medicine* **20**, 471–2 (1940).
54. Soboleski, M. R., Oaks, J. & Halford, W. P. «Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells». *FASEB J official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 440–442 (2005).
55. Steele, K. E., Linn, M.J., Schoepp, R.J., Komar, N., Geisbert, T.W., Manduca, R.M., Calle, P.P., Raphael, B.L., Clippinger, T.L., Larsen, T., Smith, J., Lanciotti, R.S., Panella, N.A. & McNamara, T.S. « Pathology of Fatal West Nile Virus Infections in Native and Exotic Birds during the 1999 Outbreak in New York City, New York ». *Vet Pathol* **37**, 208–224 (2000).
56. Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A. & Ueda, H.R. « Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging ». *Nat Protoc* **10**, 1709–1727 (2015).

57. Suthar, M. S., Diamond, M. S. & Gale Jr, M. « West Nile virus infection and immunity ». *Nat Rev Microbiol* **11**, 115–128 (2013).
58. Tainaka, K., Murakami, T.C., Susaki, E.A., Shimizu, C., Saito, R., Takahashi, K. *et al*, « Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents ». *Cell Reports* **24**, 2196-2210.e9 (2018).
59. Taylor, R. M., Work, T. H., Hurlbut, H. S. & Rizk, F. « A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **5**, 579–620 (1956).
60. Tian, T., Yang, Z. & Li, X. « Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications ». *Journal of Anatomy* **238**, 489–507 (2021).
61. Valiakos, G., Athanasiou, L.V., Touloudi, A., Papatsiros, V., Spyrou, V., Petrovska, L & Billinis, C. « West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence ». *Viral Replication* (IntechOpen, 2013). doi:[10.5772/55198](https://doi.org/10.5772/55198).
62. Vázquez, A., Sanchez-Seco, M., Ruiz, S., Molero F., Hernandez, L., Moreno, J. *et al*, « Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain ». *Emerging Infectious Diseases* , **16**(3), 549-552 (2010). doi:[10.3201/eid1603.091033](https://doi.org/10.3201/eid1603.091033).
63. Wengler, G. & Wengler, G. « Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release ». *J Virol* **63**, 2521–2526 (1989).
64. Young, J. J., Coulombier, D., Domanović, D., Zeller, H. & Gossner, C. M. « One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety ». *Euro Surveill* **24**, 1800349 (2019).
65. Zhang, B., Dong, H., Stein, D. A., Iversen, P. L. & Shi, P.-Y. « West Nile virus genome cyclization and RNA replication require two pairs of long-distance RNA interactions ». *Virology* **373**, 1–13 (2008).
66. Zhang, P.-T., Shan, C., Li, X-D., Liu, S-Q., Deng, C-L., Ye, H-Q., Shang, B-D., Lv, M., Shen, B-F., Qin, C-F. & Zhang, B. « Generation of a recombinant West Nile virus stably expressing the Gaussia luciferase for neutralization assay ». *Virus Res* **211**, 17–24 (2016).
67. Zhang, Z.-R., Zhang, H-Q., Li, X-D., Deng, C-L., Wang, Z., Li, J-Q., Li, N., Zhang, Q-Y. & Ye, H-Q. « Generation and characterization of Japanese encephalitis virus expressing GFP reporter gene for high throughput drug screening ». *Antiviral Res* **182**, 104884 (2020).
68. Zucker, R. M. « Whole insect and mammalian embryo imaging with confocal microscopy: Morphology and apoptosis ». *Cytometry Part A* **69A**, 1143–1152 (2006).

