

## Flavivirus d'intérêt chez le cheval : outils de diagnostic innovants et traitements antiviraux potentiels

Cécile Beck

Sous la direction de Sylvie Lecollinet et Stéphan Zientara  
ANSES – Virologie Maison Alfort

De nombreux *flavivirus* transmis par les moustiques comme le virus du West Nile (WNV) et le virus Usutu (USUV) ou par les tiques comme le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) ou le louping ill (LIV) sont décrits en Europe et peuvent être responsables d'infections neurologiques sévères chez l'homme (WNV et TBEV), le cheval (WNV) ou les ruminants (LIV). De plus, un autre *flavivirus*, le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) qui est responsable de méningo-encéphalites graves chez l'homme et les équidés s'étend en Asie du sud Est et pourrait un jour émerger en Europe (1). La symptomatologie induite par ces différents virus est fruste et le recours au diagnostic de laboratoire est indispensable pour confirmer ou infirmer une infection neurologique à *flavivirus*. Dans l'espèce équine, du fait d'une virémie brève, le diagnostic est généralement indirect avec mise en évidence d'anticorps IgM et IgG par des tests rapides ELISA, d'immunofluorescence indirecte (IFI) ou d'Inhibition de l'hémagglutination (IHA). Le diagnostic sérologique des infections à *flavivirus* est cependant très délicat lors de co-circulation de *flavivirus* sur un territoire car de nombreuses réactions sérologiques croisées entre *flavivirus* sont objectivées en ELISA ou IFI. Ainsi, en Europe, au moins trois *flavivirus* (USUV, TBEV et LIV) peuvent être responsables de réactions sérologiques faussement positives avec les kits ELISA West Nile. La technique de séroneutralisation par réduction des plages de lyse (PRNT) est la méthode de référence de l'OIIE pour faire la distinction entre les différents *flavivirus*. C'est une technique longue et contraignante nécessitant l'utilisation d'un laboratoire confiné P3. Ces différents constats militent donc en faveur du développement de tests de diagnostic sérologiques rapides, spécifiques et utilisant du matériel non contagieux. Nous avons développé une méthode de diagnostic sérologique multiplexe des infections à *Flavivirus* chez les équidés à l'aide de la technologie Luminex (2). Grâce à cette méthode, un sérum équin, mis en contact avec un panel d'antigènes viraux couplés à des billes magnétiques que l'on peut identifier et différencier, donnera une réaction positive uniquement avec l'antigène viral responsable de l'infection. Nous nous sommes appuyés sur la glycoprotéine E d'enveloppe des *flavivirus* qui est divisée en 3 sous domaines (DI, DII et DIII) et dont le domaine III présente une séquence protéique spécifique de chaque *flavivirus*. Des peptides DIII recombinants de différents *flavivirus* d'intérêt ont été synthétisés en collaboration avec l'Institut Pasteur en système drosophile: DIII\_WNV, DIII\_USUV, DIII\_JEV, DIII\_TBEV et DIII\_LIV. Ces antigènes recombinants ont été couplés à des billes différentes et leur antigénicité a été évaluée avec la technologie Luminex sur des sérums équins et ovins naïfs ou naturellement infectés par divers *flavivirus*. Des sérums de référence équins contre les virus WNV (lignée 1 et 2), JEV, USUV et TBEV ont également été obtenus au cours d'infections expérimentales sur des poneys à l'INRA de Nouzilly. Environ 300 sérums équins positifs pour au moins un *flavivirus* provenant d'infections expérimentales ou de terrain et 200 sérums négatifs ont été testés avec cette nouvelle technologie. En comparaison à l'ELISA de compétition, la méthode Luminex a montré une sensibilité et spécificité voisine de 99%. L'identification du *flavivirus* en cause a été de 100%, 96.8% et 90% en accord avec la méthode PRNT pour les chevaux infectés respectivement par le WNV, le TBEV et le JEV. De plus 60 sérums terrain d'ovins prélevés dans une région où circule le LIV ont été testés conjointement en ELISA, IHA et Luminex. 33 résultats positifs ont été obtenus avec les 3 méthodes et une infection par le LIV a été identifiée dans 91% des cas avec la technologie Luminex. Une amélioration de la technique doit être réalisée pour les antigènes USUV et LIV qui partagent respectivement des épitopes communs avec le JEV et le TBEV, ce qui entraîne des réactions croisées entre les billes mentionnées. Cette méthode sérologique est fiable, rapide (<3h), nécessite peu de sérums (1µl) et devrait permettre à terme un diagnostic multiplexe de toutes les infections à *flavivirus* sans recours à un travail en laboratoire confiné de niveau 3.

(1) Beck C, Jimenez Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparç-Goffart I, Zientara S, Jourdain E, Lecollinet S. 2013. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10(11):6049-83. doi: 10.3390/ijerph10116049

(2) Beck, C., P. Desprès, S. Paulou, J. Vanhomwegen, S. Lowenski, N. Nowotny, B. Durand, A. Garnier, S. Blaise-Boisseau, E. Guitton, T. Yamanaka, S. Zientara and S. Lecollinet (.). A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *Biomed Res Int*, 2015. 2015: p. 678084.