

## LE VIRUS *ALKHURMA* (FAMILLE *FLAVIVIRIDAE*, GENRE *FLAVIVIRUS*) : UN PATHOGENE EMERGENT RESPONSABLE DE FIEVRES HEMORRAGIQUES AU MOYEN-ORIENT

R.N. CHARREL, X. DE LAMBALLERIE.

*Med Trop* 2003 ; 63 : 296-299

**RESUME** • A ce jour, des flavivirus vectorisés par les tiques responsables de fièvres hémorragiques virales chez l'homme ont été isolés en Sibérie (virus de la fièvre hémorragique d'Omsk), en Inde (virus de la maladie de la forêt de Kyasanur) et en Arabie Saoudite (virus *Alkhurma*). Ces trois virus sont des agents potentiels de bioterrorisme qui requièrent un environnement confiné de niveau 4 pour leur manipulation et sont inclus dans la liste des agents pathogènes hyper-virulents éditée par le CDC. Le virus *Alkhurma* a été isolé en 1995 chez des patients présentant des fièvres hémorragiques en Arabie Saoudite. La transmission à l'homme semble pouvoir s'effectuer par voie transcutanée (plaie cutanée souillée avec du sang de vertébré infecté), par piqûre de tique infectée, ou par ingestion de lait contaminé non pasteurisé. A ce jour, 24 cas d'infection humaine symptomatique ont été recensés avec une mortalité de 25 % (6 décès sur 24). L'existence de cas pauci- ou asymptomatiques est probable mais non décrite. La séquence complète du virus *Alkhurma* a été déterminée et rapportée en 2001, résultat d'une collaboration franco-anglo-saoudienne. Les études phylogénétiques montrent que son plus proche parent connu est le virus Kyasanur, et que ces 2 virus dérivent d'un ancêtre commun. L'étude génétique comparative de souches humaines collectées de façon séquentielle montre une très faible variabilité génétique ce qui pourrait avoir des implications importantes au plan du diagnostic et de la prévention vaccinale.

**MOTS-CLES** • *Flavivirus* - *Flaviviridae* - Fièvre hémorragique virale - Bioterrorisme - Arabie Saoudite.

**ALKHURMA VIRUS (FAMILY *FLAVIVIRIDAE*, GENUS *FLAVIVIRUS*): AN EMERGING PATHOGEN CAUSING HEMORRHAGIC FEVER IN THE MIDDLE EAST**

**ABSTRACT** • To date tick-borne flaviviruses causing hemorrhagic fevers in humans have been isolated in Siberia (*Omsk hemorrhagic fever virus*), India (*Kyasanur Forest disease virus*), and Saudi Arabia (*Alkhurma virus*). Because of their potential use as biological weapons for bioterrorism, these 3 viruses require level 4 biosafety handling facilities and have been listed as hyper-virulent pathogens by the Center for Disease Control and Prevention. *Alkhurma* virus was isolated in 1995 from patients with hemorrhagic fever in Saudi Arabia. Current evidence suggests that transmission to humans can occur either transcutaneously either by contamination of a skin wound with the blood of an infected vertebrate or bites of an infected tick or orally by drinking unpasteurized contaminated milk. To date a total of 24 symptomatic human cases have been recorded with a mortality rate at 25% (6/24). Pauci-symptomatic or asymptomatic cases are likely but epidemiologic data are currently unavailable. The complete coding sequence of the prototype strain of *Alkhurma* virus was determined and published in 2001 based on international research project involving investigators from France, Great Britain, and Saudi Arabia. Phylogenetic studies demonstrate that closest known relative of *Alkhurma* virus is Kyasanur Forest disease virus and that both viruses share a common ancestor. Genetic analysis of several human strains sequentially isolated over a 5-year period showed a very low diversity. This finding has important potential implications for diagnosis and vaccination.

**KEY WORDS** • *Flavivirus* – *Flaviviridae* – Viral hemorrhagic fever – Bioterrorism – Saudi Arabia.

Le virus *Alkhurma* (ALK) a été isolé pour la première fois à Jeddah (Arabie Saoudite) en 1995 à partir du sang d'un boucher d'abattoir hospitalisé pour un syndrome de fièvre hémorragique sévère avec thrombocytopenie. Depuis le premier isolement, 24 cas d'infection humaine symptomatique ont été recensés en Arabie Saoudite avec une mortalité de 25 % (6 décès sur 24). L'identification de ce virus comme membre du genre *Flavivirus* a été faite à partir des résultats d'un test d'immunofluorescence avec un anticorps monoclonal spécifique de genre, et du séquençage d'une région de

220 nucléotides présentant une homologie de 89% avec le virus de la maladie de la forêt de Kyasanur (KFD) dans le gène de la polymérase virale (1). Le séquençage du génome complet du virus ALK a permis de confirmer sa parenté avec le virus KFD (2). Le virus KFD a été isolé pour la première fois en Inde dans la forêt dont il porte le nom (District de Shimoga, Inde)(3, 4) et cause annuellement environ 500 cas humains. A ce jour, des flavivirus vectorisés par les tiques responsables de fièvres hémorragiques virales chez l'homme ont été isolés en Sibérie (virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHF)), en Inde (virus KFD) et en Arabie Saoudite (virus ALK). Ces 3 virus sont des agents potentiels de bioterrorisme. Ils nécessitent d'être manipulés dans un environnement technique de niveau 4 (NSB-4) et sont inclus dans la catégorie A sur la liste des agents pathogènes hyper-virulents éditée par le CDC (5).

• Travail de l'Unité des Virus Emergents (EA3292 / IRD034 / IFR48) (R.N.C., MD, PhD; X.D.L., MD, PhD), Faculté de Médecine, Marseille, France.

• Correspondance : R.N. CHARREL, Unité des Virus Emergents (EA3292/IRD034/IFR48), 27 bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France • Fax : +33 (0) 4 91 32 44 95 • E-mail : RNC-VIROPHDM@GULLIVER.FR •

Tableau I - Caractéristiques épidémiologiques de 11 cas humains d'infection par le virus Alkhurma.

Souche	Date d'isolement	Nationalité	Profession	Sexe	Source of infection	Origine	Evolution
87	Mai 1994	égyptienne	boucher	male	plaie	La Mecque	favorable*
228	Mai 1994	égyptienne	boucher	male	plaie	La Mecque	décès
1176	Septembre 1995	égyptienne	boucher	male	plaie	La Mecque	décès
MOS	Septembre 1995	égyptienne	boucher	male	plaie	Jeddah	favorable*
1209	Octobre 1995	saoudienne	soldat	male	lait cru de chameau	Jeddah	favorable*
5975	Juin 1997	saoudienne	chauffeur routier	male	lait cru de chameau	Jeddah	décès
7344	Mars 1998	saoudienne	ingénieur	male	piqûre de tique	Jeddah	favorable*
7466	Mars 1998	égyptienne	boucher	male	plaie	Jeddah	favorable*
7471	Mars 1998	égyptienne	boucher	male	plaie	Jeddah	favorable*
7586	Avril 1998	saoudienne	étudiant	male	piqûre de tique	Jeddah	décès
9518	Juin 1999	érythréenne	éleveur de poules	male	lait cru de chameau	Jeddah	favorable*

\*favorable = évolution vers la guérison sans séquelle

## EPIDEMIOLOGIE

Les données épidémiologiques concernant les 11 souches isolées chez des patients malades en Arabie Saoudite sont présentées dans le tableau I (Charrel, données non publiées). Les isolats ont été collectés sur une période de 5 ans (mai 1994 à juin 1999). L'analyse de la distribution saisonnière montre la présence de 2 pics correspondant aux périodes mars-juin et septembre-octobre (Fig. 1). Tous les cas sont survenus chez des patients vivant à Jeddah ou à La Mecque (distantes de 75 Km) représentant une zone de 5000 km<sup>2</sup> (Fig. 2). L'interrogatoire a permis d'identifier trois modes d'infection différents: (i) voie parentérale transcutanée (peau lésée) chez les bouchers d'abattoirs (n=6), (ii) piqûre de tique (n=2), (iii) consommation de lait non pasteurisé de chameau (n=3). Malgré les différents modes d'infection, il existe une grande homogénéité dans la présentation clinique et biologique chez l'homme. Il est important d'établir si la transmission par voie respiratoire existe pour le virus ALK comme cela a été rapporté dans la cas d'autres *flavivirus* responsables d'encéphalites à tiques (6). Les conditions environnementales déterminant la survie et la propagation sont très différentes pour les virus ALK en Arabie Saoudite et KFD en Inde. Les infections humaines par le virus KFD résultent le plus souvent d'un contact avec des tiques infectées ou des singes vivant en zone d'épidémie. Les

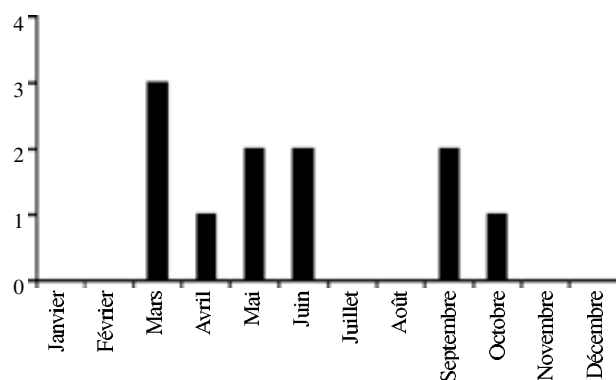


Figure 1 - Répartition annuelle des cas humains d'infection par le virus Alkhurma en Arabie Saoudite (1994-1999).

données préliminaires disponibles pour le virus ALK suggèrent que les cas humains sont fréquemment secondaires à un contact avec des moutons ou des tiques du mouton dans un environnement semi-désertique. Il existe très peu d'information sur les tiques circulant en Arabie Saoudite, leurs cycles saisonniers et leur préférence en terme d'hôtes vertébrés. Dans le cas du virus KFD, son plus proche cousin, des études de grande envergure menées en Inde ont permis d'établir que les 2 espèces de tiques (*Ixodes petauristae* et *Ixodes ceylonensis*) jouant un rôle dans la transmission virale possèdent des pics saisonniers différents. Il est impossible d'affirmer que les mêmes déterminants existent pour le virus ALK, mais cela pourrait expliquer la présence des deux pics épidémiologiques annuels. Les chameaux et les moutons semblent permettre la réplication du virus ALK à des niveaux compatibles avec l'infection chez l'homme; d'autres vertébrés, non encore identifiés, pourraient être impliqués dans l'établissement du cycle naturel. Des rapports récents publiés sur le site ProMED rapportent d'autres cas en 2002 (n=1) et en 2003 (n=7). A ce jour un total de 24 cas humains a été rapporté dont 6 cas mortels (mortalité 25 %); la mortalité globale attribuée au virus ALK serait donc supérieure à celle observée avec le virus KFD en Inde (2-10 %)(4). Devant la gravité de la maladie chez l'homme, il est important de mettre en route des programmes de surveillance humains, vétérinaires et entomologiques. En effet, la connaissance de l'épidémiologie du virus ALK reste très fragmentaire et nécessite des investigations sérieuses portant :

- sur les populations humaines pour répondre aux questions suivantes: existe-t-il des infections asymptomatiques ou pauci-symptomatiques ? si oui, quel est le ratio infection symptomatique / infection asymptomatique ? quels sont les modes de transmission et leur fréquence relative ?
- sur le ou les vecteurs : quels sont les espèces de tiques vectrices pour le virus ALK ? existe-t-il comme dans le cas du virus KFD en Inde une bi-saisonnalité due à l'implication de deux espèces de tiques à cycle différent ?
- sur les vertébrés en tant que réservoir et qu'hôtes amplificateurs (vertébrés ne présentant pas une virémie suffisamment élevée ou longue: quelles sont les animaux impliqués dans la maintenance naturelle du virus ALK ? quelle est l'implication respective du bétail, des petits rongeurs et des oiseaux ?



Figure.3 - Relations phylogénétiques entre les 11 souches de virus Alkhurma et les autres flavivirus transmis par les tiques. La racine de l'arbre est représentée par les virus Apoi et Rio Bravo, 2 flavivirus non vectorisés par des arthropodes.

#### ANALYSE GENETIQUE DE LA SEQUENCE COMPLETE DU VIRUS ALKHURMA

La séquence complète de la souche 1176 du virus ALK a été déterminée en 2001 par un travail collaboratif impliquant des équipes française, saoudienne et anglaise (2). Elle a été obtenue à partir de 10 produits de PCR recouvrant en utilisant des amorces dégénérées correspondant aux sites enzymatiques conservés. La région codante est de 10 248 nucléotides et code pour une polyprotéine unique de 3416 acides aminés (numéro d'accèsion GenBank AF331718). Les analyses génétiques et phylogénétiques établies à partir du génome complet démontrent que le virus ALK est un membre du groupe des *flavivirus* de mammifères vectorisés par les tiques. L'analyse à partir des alignements en acides aminés des sites de clivage de la polyprotéine permet leur identification certaine. Les protéines AnchC, PrM, M, and NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B et NS5 sont de même taille. La classification du virus ALK au sein du groupe *flavivirus* de mammifères transmis par les tiques au sein du genre *Flavivirus* se fait dans l'enveloppe sur la base 1) des 12 résidus cystéine impliqués dans les ponts disulfure, 2) des trois sites potentiels de glycosylation, 3) du pentapeptide DSGHD spécifique des *flavivirus* transmis par les tiques (7), 4) d'une séquence du peptide de fusion identique à celle des virus Louping ill, encéphalite à tique, Langat et KFD. La proximité entre ALK et KFD est attestée sur l'analyse comparative des protéines d'enveloppe (8) par 1) le tripeptide spécifique AKG dans la protéine Vir, 2) l'insertion d'une arginine en position 93 de la protéine Vir, 3) l'hexapeptide spécifique EHLPKA dans l'enveloppe (7), 4) la conservation du motif EGSK dans l'enveloppe responsable de l'absence de réponse avec l'anticorps monoclonal 4.2 (9), 5) la substitution commune aux positions 76 et 489 de l'enveloppe (2).

## GENETIQUE ET PHYLOGENIE

Une analyse génétique portant sur les séquences des gènes d'enveloppe (742 nt), NS3 (757 nt) et polymérase (723 nt) de 11 isolats viraux collectés chez des patients de Mai 1994 à Juin 1999 montre une variabilité génétique très faible (0,4-0,9 %) portant majoritairement sur des sites synonymes, donc n'impactant pas sur les séquences protéiques (Charrel et al, données non publiées). Une des souches a été passée plusieurs fois dans différents organismes (chèvre, souris, cellules Vero): le nombre de mutations n'est pas statistiquement différent des autres souches. Il est important de souligner que la stabilité génétique est respectée quelles que soient (i) l'année d'isolement, (ii) la période de l'année durant laquelle la souche a été isolée, (iii) le pronostic de l'infection (résolution sans séquelle ou décès), (iv) le mode d'infection chez l'homme, (v) la nature de l'hôte à partir duquel l'infection humaine a le plus probablement été acquise, (vi) la région dans laquelle le patient habite. Apparemment, aucune signature génétique ne peut être associée au mode d'infection, ni à la nature du réservoir et/ou du vecteur. Une si faible variabilité génétique demande à être confirmée par des études complémentaires impliquant un plus grand nombre de souches obtenues à partir de moutons, de chameaux et de tiques. Bien que cela soit peu probable, il est possible que les souches causant des infections symptomatiques chez l'homme soient un sous-ensemble d'une population virale beaucoup plus hétérogène. Si elle est confirmée, l'homogénéité génétique des différentes souches de virus ALK est un avantage pour la conception et le développement de tests diagnostiques moléculaires et sérologiques.

## FAUT-IL CONSIDERER LE VIRUS ALKHURMA COMME UNE NOUVELLE ESPECE A PART ENTIERE OU COMME UN SOUS-TYPE OU VARIANT DU VIRUS KFD ?

Cette question a été abordée dans l'article de Charrel et Coll (2). Les auteurs apportent des arguments en faveur de la seconde option; cependant, à ce jour le cas du virus ALK n'a pas été abordé par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) et lui seul est compétent pour répondre à cette question (10). Néanmoins, le critère génétique représenté par une valeur seuil de 14 % entre séquence acides aminés de l'enveloppe semble favoriser la seconde possibilité puisque la divergence génétique entre les virus ALK et KFD est d'environ 8 % au niveau nucléotidique et 3 % au niveau acides aminés. La figure 3 représente les relations phylogénétiques entre les 11 souches de virus ALK et d'autres *flavivirus* transmis par les tiques. L'existence d'un ancêtre phylogénétique commun aux virus ALK et KFD est supportée par une valeur de *bootstrap* de 100%. La très grande homogénéité génétique des souches étudiées est à mettre en perspective avec les données antigéniques établies pour le virus KFD (4); elles n'ont malheureusement pas été étudiées sur le plan génétique. La distance génétique obser-

vée entre les virus ALK et KFD est plus faible que celle séparant les virus Powassan et Deer-tick, qui sont considérés comme 2 variants génétiques (sous-types) d'une même espèce virale (10, 11). Il est donc rationnel de proposer que ALK et KFD soient considérés comme 2 variants de l'espèce virale Kyasaur Forest disease virus, qui possèdent un ancêtre commun.

## CONCLUSION

Le virus ALK est à ce jour le premier *flavivirus* agent de fièvre hémorragique à avoir été totalement séquencé. Parmi les futures directions dans lesquelles il faut diriger les recherches portant sur le virus ALK, les priorités consistent à (i) élucider l'épidémiologie du virus et des pathologies humaines associées, (ii) développer des tests diagnostiques moléculaires et sérologiques, (iii) évaluer l'existence et le degré de protection croisée conférée par le vaccin inactivé contre le virus de l'encéphalite à tiques vis-à-vis du virus ALK et plus généralement des *flavivirus* transmis par les tiques responsables de fièvres hémorragiques virales représentant des agents potentiels de bioterrorisme ■

## REFERENCES

- 1 - ZAKI AM - Isolation of a *flavivirus* related to the tick-borne encephalitis complex from human cases in Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; **91** : 179-181.
- 2 - CHARREL RN, ZAKI AM, ATTOUI H et Coll - Complete coding sequence of the Alkhurma virus, a tick-borne *flavivirus* causing severe hemorrhagic fever in humans in Saudi Arabia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287** : 455-461.
- 3 - CDC - Pathogen List. <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist.asp>
- 4 - SCHERER WF, EDDY GA, MONATH TP, WALTON TE - Laboratory safety for arboviruses and certain other viruses of vertebrates. *Am J Trop Med Hyg* 1980; **29** : 1359-1381.
- 5 - WORK TH, TRAPIDO H - Kyasaur Forest disease, a new virus disease in India. *Indian J Med Sci* 1957; **11** : 341-345.
- 6 - MONATH TP, HEINZ FX - *Flaviviruses*. In «FIELDS BN, KNIPE DM, HOWLEY PM et Coll - Fields Virology». Lippincott-Raven Publishers ed, Philadelphia, 1996, pp 961-1034.
- 7 - SHIU SYW, AYRES MD, GOULD EA - Genomic sequence of the structural proteins of louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus. *Virology* 1991; **180** : 411-415.
- 8 - VENUGOPAL K, GRITSUN T, LASHKEVITCH VA, GOULD EA - Analysis of the structural protein gene sequence shows Kyasaur Forest disease virus as a distinct member in the tick-borne encephalitis virus serocomplex. *J Gen Virol* 1994; **75** : 227-232.
- 9 - VENUGOPAL K, BUCKLEY A, REID HW, GOULD EA - Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows close homology to louping ill virus. *Virology* 1992; **190** : 515-521.
- 10 - HEINZ FX, COLLETT MS, PURCELL RH et Coll - Flaviviridae. In «VAN REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM, BISHOP DH et Coll - Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses». Academic Press ed, San Diego, USA, 2000, pp 859-878.
- 11 - TELFORD SR, ARMSTRONG PM, KATAVOLOS P et Coll - A new tick-borne encephalitis-like virus infecting New England deer tick, *Ixodes dammini*. *Emerg Infect Dis* 1997; **3** : 165-170.