Etude des mécanismes de haute pathogénicité des Henipavirus

Kévin Dhondt

▶ **To cite this version:**

Kévin Dhondt. Etude des mécanismes de haute pathogénicité des Henipavirus. Virologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2014. Français. NNT : 2014ENSL0954 . tel-01249560

HAL Id: tel-01249560
https://theses.hal.science/tel-01249560

Submitted on 4 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Sciences de la Vie

Laboratoire : Immunobiologie des Infections Virales
Centre International de Recherche en Infectiologie – U1111 INSERM

Ecole Doctorale : Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

présentée et soutenue publiquement
le 21 Novembre 2014
par

Monsieur DHONDT Kévin, Pierre, Louis

ETUDE DES MECANISMES DE HAUTE PATHOGENICITE DES HENIPAVIRUS

Directeur de thèse : Mme Branka HORVAT

Devant la commission d'examen formée de :

M. Daniel DUNIA Directeur de Recherche à l'UMR1043 INSERM de TOULOUSE, *Rapporteur*
M. Bernard DELMAS Directeur de Recherche à l'UR892 INRA de JOUY-EN-JOSAS, *Rapporteur*
Mme Laurence GARNIER Expert technique à la DGA de BAGNEUX, *Examinatrice*
Mme Branka HORVAT Directrice de Recherche à l'U1111 INSERM de LYON, *Directrice*
Mme Sonia LONGHI Directrice de Recherche à l'UMR 7267 INSERM de MARSEILLE, *Examinatrice*
M. Renaud MAHIEUX Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de LYON, *Examinateur*

« J'ai toujours près de moi, six fidèles amis.

C'est à eux que je dois tout ce que j'ai appris.

Leurs noms sont : Quand, Où, Quoi, Comment, Pourquoi et Qui. »

Rudyard Kipling (1865-1936) - "The serving men"

A notre président de jury,

Monsieur le Professeur Renaud Mahieux

Professeur des Universités

Virologie

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A nos rapporteurs,

Monsieur le Docteur Daniel Dunia

Directeur de Recherche à l'UMR1043 INSERM de Toulouse

Virologie

Qui nous a fait l'honneur de guider la réalisation de ce travail.

En remerciement de sa disponibilité et de toute l'énergie qu'il nous a consacrée,

Hommages respectueux.

Monsieur le Docteur Bernard Delmas

Directeur de Recherche à l'UR892 INRA de Jouy-en-Josas

Virologie

Qui nous a fait l'honneur de guider la réalisation de ce travail.

En remerciement de ses conseils et de sa présence dans notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

Remerciements

Bien qu'elle se trouve au début, la page des remerciements s'écrit toujours à la fin. C'est une bien curieuse tradition car si cette page est finalement le point final de l'aventure scientifique qu'est la thèse, elle est surtout celui d'une aventure humaine aux rencontres inattendues, riches en couleurs et, dans la plupart des cas, fructueuses. C'est donc avec beaucoup de plaisir que je vais tâcher de remercier l'ensemble des gens qui ont contribué positivement à cette expérience humaine.

Pour commencer je souhaite remercier **Branka Horvat**, ma directrice de thèse, qui a tenté le pari un peu fou de prendre en stage puis en thèse un vétérinaire à l'expérience de laboratoire très limitée mais de me faire confiance. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir laissé l'autonomie nécéssaire pour développer ma créativité et mon sens des responsabilités. Merci aussi pour m'avoir laissé équilibrer mes vies professionnelles et personnelles, dans le quotidien mais aussi lors de mes longs voyages …

Je souhaite aussi vivement remercier **Cyrille Mathieu,** qui a été d'une patience et d'une pédagogie remarquable à mon arrivée au laboratoire. C'est avec toi que j'ai fait mes premières armes et que j'ai gagné mon autonomie. Malgré les remous qui nous opposent parfois, je sais ce que je te dois et je connais tes grandes qualités humaines.

Il y a ensuite les personnes qui font que la thèse n'est pas qu'une aventure scientifique, à commencer par **Louis-Marie Bloyet**. Nous avons démarré en même temps nos thèses respectives mais c'est une histoire d'amitié que nous avons écrit ensemble. Je souhaite que cette histoire continue à toujours s'alimenter de cette estime mutuelle que nous nous portons. Quand je dis que cette thèse aura été l'occasion de belles rencontres, tu illustres parfaitement le propos.

Je souhaite aussi remercier **Marie Châlons** qui m'a accompagné sur mes projets au début de ma thèse. Ta rigueur et ta bonne humeur, tes envolées syndicalistes et ta franchise à toute épreuve, mais aussi ton courage légendaire et ton sens indéfectible de la diplomatie (!) m'ont énormément manqué après ton départ. Nous avons heureusement su entretenir ces liens d'amitié au-delà du labo et, même si tu brilles par ton absence le jour de ma

soutenance (et je n'en attendais pas moins de ta part !), je sais que nous continuerons à profiter de cette belle amitié.

Le petit dernier de la bande à Nipah, c'est **François Enchéry** et c'est lui qui reprend le flambeau. Moi-même en tant que grand tri-athlète, je vais tâcher de te décrire ce qui t'attend : tu vas courir derrière des résultats, nager en eaux troubles mais je te garanti que finalement tout va rouler ! C'est en tout cas pour moi un vrai plaisir que d'avoir un collègue véto, on se comprend même si je n'arrive pas toujours à lire dans ta tête les fins de tes raisonnements alambiqués. Ton humour cynique va très certainement me manquer mais je ne doute pas du fait que tu sauras régulièrement me donner des nouvelles.

Parmi les gens du labo qui ont marqué cette thèse il y a aussi :

Vanessa, qui a su me guider et me remettre sur les rails pendant les périodes de creux. Je n'oublierais jamais la rédaction et la mise au point des procédures MOT avec toi et à quel point des tâches aussi pénibles peuvent paraître aisées lorsqu'on est bien entouré.

Denis, qui a su chercher et trouver la petite bête quand elle se cachait dans mes manips, titiller ma curiosité et provoquer juste suffisamment mon ego pour me forcer à me dépasser. Maîtriser ce jeu avec finesse n'est pas chose aisée, mais je dois reconnaître que tu excelles dans cet art !

Noémie, l'histoire commence à peine mais j'espère que j'aurais réussi à te transmettre ma fascination pour ces bestioles étranges et mystérieuses que sont les chauves-souris. J'espère bien avoir l'occasion d'obtenir la fin de l'histoire !

Joanna, Carine, Jérémy et Géraldine, et les exilés, **Joséphine, Jade et Olga**, pour tous les bons moments passés ensemble au travail et en dehors du labo pour goûter à la cuisine des 4 coins du monde ou pour une sortie au zoo !

Les anciens stagiaires du labo, particulièrement **Erica, Dylan, Cindy et Cédric**, vous avez été, à un moment, les petites mains mais de grands personnages de l'équipe et je ne vous oublie pas.

Je souhaite aussi remercier tous les gens qui m'ont aidé au cours de ma thèse :

Au laboratoire P4 : Christophe qui gère mes demandes d'entrée et ma sécurité avec beaucoup de bienveillance, Stéphane qui m'a formé au labo P4 et qui m'a toujours aidé dans mes démarches, les techniciennes et techniciens de l'animalerie A4, Audrey, Aurélie, Damaris, Stéphane qui se sont démenés pour mener à bien mes manips animales, le non moins bienveillant personnel de la gestion des souches, Stéphanie, Anne et Laura. Aux autres utilisateurs qui m'ont forcément accompagné, aidé ou dépanné d'un oubli un jour ou l'autre.

Au PBES : Jean-Louis et Marie pour avoir pris le soin de comprendre mes contraintes, Nadine, David et Céline pour s'être occupé de mes bêbêtes, Sophie pour le génotypage.

Au CIRI : Tous nos collaborateurs qui m'ont aidé à réaliser mes expériences par leur soutien matériel, logistique ou intellectuel, particulièrement au 2ème étage de la tour CERVI où l'ambiance est … animée ! Une mention toute particulière à Bariza, Isabelle (même si tu n'es pas vraiment au CIRI !), Marie-Cécile et Laurent qui auront eu l'occasion de m'aider à de multiples reprises.

Je souhaite aussi brièvement remercier ma famille. Alors, c'est ma deuxième thèse et j'avais déjà tout dit dans la première. Du coup, je vais faire court et vous remercier à nouveau pour tout votre amour, votre soutien et vos enseignements. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui, je vous aime. Je veux aussi remercier Julie, ma femme, car malgré l'investissement que représente une thèse, elle a toujours été présente pour me soutenir dans les meilleurs et les pires moments. J'espère pouvoir être à la hauteur quand il s'agira de renvoyer l'ascenseur mais notre famille est l'exemple même que l'on peut se marier et avoir des enfants (enfin presque) même pendant sa thèse !

Sommaire

INTRODUCTION 18

PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HENIPAVIRUS 19

I. GENERALITES SUR LES HENIPAVIRUS 19

A. Historique 19

1. Le virus Hendra 19
2. Le virus Nipah 20

B. Classification et nomenclature 22

C. Caractéristiques structurales et moléculaires des Henipavirus 24

1. Morphologie 24
2. Organisation génomique et protéique 25

a. Les protéines structurales 25

b. Les protéines non-structurales 28

3. Le cycle de réplication viral 29

D. Pathogénie 30

1. Voies d'entrée et dissémination du virus 30
2. Cellules cibles et récepteurs d'entrée 32
3. Interactions avec le système immunitaire inné 33

a. Détection du pathogène 33

b. Signalisation de la voie IFN-I 35

c. Mécanismes d'échappement viral 35

II. EPIDEMIOLOGIE 37

A. Espèces cibles 37

1. Les chauves-souris 37
2. Les chevaux 39
3. Les porcs 39
4. Les hommes 40
5. Les animaux domestiques 41
6. Les modèles animaux expérimentaux 42

B. Aire de répartition géographique 44

C. Transmission à l'homme 45

1. Transmission par aérosols 45
2. Transmission porcine et équine 45
3. Transmission interhumaine 46
4. Contamination alimentaire 47

III. TABLEAU CLINIQUE 48
A. Symptômes 48
1. Chez la chauve-souris frugivore (*Pteropus sp*) 48
2. Chez le porc 49
a. Porcelets avant sevrage (< 4 semaines) 49
b. Porcelets au sevrage (> 4 semaines) et à l'engraissement (< 6 mois) 49
c. Truies et verrats reproducteurs 49
3. Chez le cheval 50
4. Chez l'homme 50
5. Autres 53
B. Lésions 54
1. Macroscopiques 54
2. Microscopiques 55
IV. DIAGNOSTIC DE CERTITUDE EN LABORATOIRE 57
A. Identification de l'agent pathogène 57
1. Isolement du virus et caractérisation 57
2. Test de séroneutralisation virale : différenciation entre virus Hendra et virus Nipah . 59
3. Méthodes de reconnaissance basée sur les acides nucléiques 59
4. Détection d'antigènes d'Henipavirus dans des tissus fixés pour immunohistochimie. 59
B. Epreuves sérologiques 60
1. Test de séroneutralisation du virus 60
2. Épreuves immuno-enzymatiques 60
V. PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT 61
A. Prophylaxie socio-environnementale 61
B. Prophylaxie sanitaire 62
C. Prophylaxie médicale 63
D. Traitement 63
VI. CONTEXTE D'ETUDE 64
A. Classification du virus au niveau 4 de biosécurité 64
B. Le travail en conditions P4 65
C. Comparaison des deux souches de virus Nipah existantes 65
D. Les enjeux économiques liés aux épidémies de virus Nipah 66
E. Utilisation des Henipavirus comme agents de bioterrorisme 66
PARTIE II. OBJECTIFS 68
PARTIE III. ROLE DES HEPARANES SULFATES DANS L'INFECTION PAR LES HENIPAVIRUS 70

I. LES HEPARANES SULFATES 70
II. AMELIORATION DE L'INFECTION SOUS LA DEPENDANCE DES HEPARANES SULFATES 71
PARTIE IV. ETUDE DE LA PATHOGENESE DES HENIPAVIRUS CHEZ LA SOURIS. 97
I. INTERETS ET LIMITES DES MODELES ANIMAUX EXISTANTS 97
A. Les primates non-humains 97
1. Le singe vert africain (*Chlorocebus aethiops*) 97
2. Le saïmiri (Saimiri sciureus) 99
B. Le hamster doré (Mesocricetus auratus) 99
C. La souris (*Mus musculus*) 100
II. LA SOURIS TRANSGENIQUE IFNAR KO 100
III. AUTRES LIGNEES DE SOURIS 102
A. Déficiences de l'immunité innée 102
B. Déficiences de l'immunité adaptative 103
IV. ROLE DES MACROPHAGES 106
A. Généralités 106
1. Les macrophages dérivés des monocytes circulants 107
2. Les macrophages résidents 107
B. Etude du rôle des macrophages dans l'infection du virus Nipah chez la souris 108
PARTIE V. PERTURBATION DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'IMMUNITE INNEE PAR LES PROTEINES VIRALES NON STRUCTURALES 136
I. ROLE DES PROTEINES NON STRUCTURALES VIRALES DANS L'EVASION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE 136
A. Perturbation de la voie des RLR et TLR 136
B. Perturbation de la voie de l'interféron de type I 137
II. ARTICLE EN COURS DE PREPARATION : PERTURBATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NF-KB PAR LES PROTEINES VIRALES NON STRUCTURALES 138
A. Introduction 138
B. Matériel et méthode 141
1. Lignées cellulaires 141
2. Constructions plasmidiques 141
3. Analyse par Western-Blot 142
4. Virus et test fonctionnel avec gène rapporteur Luciférase en contexte d'infection .. 143

5. Test fonctionnel avec gène rapporteur Luciférase en contexte de transfection 144
6. Test de complémentation protéique basé sur la luciférase (Figure 3) 144
7. Analyses statistiques 146
C. Résultats préliminaires 146
1. Effet de l'infection par le virus Nipah sur les voies de signalisation de NF-κB 146
2. Effets des protéines non structurales du virus Nipah sur les voies de signalisation de NF-κB en contexte de transfection 148
3. Interactions des protéines non structurales du virus Nipah avec les protéines IKKs . 150
D. Analyse des résultats 152
PARTIE VI. DISCUSSION 155
I. AXE 1 : ROLE DES HEPARANES SULFATES DANS L'INFECTION AUX HENIPAVIRUS 155
II. AXE 2 : ETUDE DE LA PATHOGENESE DES HENIPAVIRUS CHEZ LA SOURIS 159
III. AXE 3 : PERTURBATION DES VOIES DE SIGNALISATION DE L'IMMUNITE INNEE PAR LES PROTEINES NON STRUCTURALES DES HENIPAVIRUS 164
CONCLUSION 168
ANNEXES 181
I. ANNEXE 1 : ARTICLE SUR LE VIRUS TIOMAN EN COLLABORATION AVEC PIERRE-OLIVIER VIDALAIN, INSTITUT PASTEUR, PARIS 181
II. ANNEXE 2 : REVUE SUR LES MODELES ANIMAUX APPLICABLES AUX HENIPAVIRUS 196
III. ANNEXE 3 : CHAPITRE SUR LES HENIPAVIRUS DANS UN OUVRAGE SUR LES MONONEGAVIRALES D'IMPORTANCE VETERINAIRE 217

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation des premières épidémies liées au virus Nipah en Malaisie et à Singapour entre septembre 1998 et avril 1999. 20

Figure 2 : Chronologie et localisation des cas humains d'infection par le virus Nipah déclarés par les autorités malaisiennes entre octobre 1998 et avril 1999. Adapté à partir de (Anon, 1999). 22

Figure 3 : Classification des Paramyxovirinae d'après le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) (Anon, s. d.). 23

Figure 4 : Image de microscopie électronique du virus Hendra montrant les spicules sur l'enveloppe (flèches) et la nucléocapside en chevrons (triangles). D'après (Halpin et al, 2000) 25

Figure 5 : Organisation génomique du virus Nipah et structure des virions. 28

Figure 6 : Cycle de réplication du virus Nipah. 29

Figure 7 : Modèle de dissémination du virus Nipah utilisant les leucocytes. Légende : C.E. – Cellule endothéliale ; C. M. L. – Cellule musculaire lisse. Adapté de (Mathieu et al, 2011) 31

Figure 8 : Immunomarquage positif des antigènes du virus Nipah dans les axones du nerf olfactif. Coupe transversale des cornets nasaux. Tiré de (Weingartl et al, 2005). 32

Figure 9 : Détection des acides nucléiques viraux et voies de signalisation associées. D'après (Gilliet et al, 2008) 34

Figure 10 : Voies d'inhibition de la réponse interféron par les protéines non structurales des Paramyxoviridae. Adapté de (Eaton et al, 2006) 36

Figure 11 : Colonie de Pteropus giganteus au Sri-Lanka. Photo de Bernard Gagnon. . 38

Figure 12 : Répartition géographique des foyers infectieux à Henipavirus et des chauves-souris frugivores de la famille des Pteropodidae. 45

Figure 13 : Mode opératoire pour la collecte de sirop de palme. Adapté à partir de (Nahar et al, 2010) 47

Figure 14 : Chauves-souris surprises en train de lécher (flèche noire) et d'uriner (flèche blanche) dans la sève collectée (Salah Uddin Khan et al, 2011) 48

Figure 15 : Radiographies pulmonaires de 4 patients, montrant une opacité diffuse bilatérale couvrant la majorité des poumons, compatibles avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Issu de (Hossain et al, 2008). 52

Figure 16 : Image par résonance magnétique du cerveau d'un homme malaisien de 44 ans atteint par le virus Nipah. L'image montre de multiples lésions subcorticales distinctes. Extrait de (Sarji et al, 2000). 54

Figure 17 : Image par résonance magnétique du cerveau d'une femme bangladaise de 36 ans atteinte par le virus Nipah. L'image montre des anomalies de signal diffuses, confluentes en zones corticale et subcorticales. Extrait de (Sejvar et al, 2007)..... 55

Figure 18 : Syncytium observé dans le tissu pulmonaire d'un porc infecté par le virus Nipah. Les flèches montrent des inclusions virales éosinophiliques. Barre = 50 µm. Tiré de (Hooper et al, 2001). 56

Figure 19 : Vascularite dans un vaisseau pulmonaire humain. La flèche noire montre un syncytium de cellules endothéliales et la flèche blanche montre une infiltration leucocytaire transmurale. Tiré de (Wong et al, 2002a). 56

Figure 20 : Natte de bambou couvrant le dispositif destiné à récolter le sirop de palme et empêchant l'accès des chauves-souris. Tiré de (Salah Uddin Khan et al, 2011). 62

Figure 21 : [A] Sécrétions mousseuses sanguinolentes autour des narines et de la bouche. [B] Poumons hypertrophiés avec de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées. Extrait de (Geisbert et al, 2010). 98

Figure 22 : [A] Cerveau présentant une congestion sévère (flèches noires) avec de possibles hémorragies méningées. Fluide (flèches blanches) suggérant l'existence d'un œdème modéré des méninges. [B] Double marquage d'un vaisseau sanguin cérébral montrant la colocalisation du virus Nipah dans les cellules endothéliales : cellule endothéliale (vert) et antigènes du virus Nipah (rouge), contre-coloration DAPI (bleu). Grossissement x400. Extrait de (Geisbert et al, 2010). 98

Figure 23 : Voies de la lymphopoïèse. En rouge, protéine dont l'absence entraîne l'arrêt des mécanismes de différentiation de cette voie. 105

Figure 24 : Mode de distribution des liposomes de clodronate en fonction du site d'injection. D'après www.clodronateliposomes.com. 109

Figure 25 : Modèle d'actions des macrophages $CD169^{+}$ lors d'une infection par le virus Nipah..... 111

Figure 26 : Représentation simplifiée des voies canonique et non canonique de NF-κB. 140

Figure 27 : HT-GPCA (High-Throughput Gaussia princeps Luciferase-Based Complementation Assay), test de complémentation protéique basé sur la luciférase Gaussia princeps. 145

Figure 28 : Test fonctionnel avec gène rapporteur luciférase en contexte d'infection. 147

Figure 29 : Test fonctionnel avec gène rapporteur luciférase en contexte de transfection. 149

Figure 30 : Mesures par PCA des interactions entre les protéines du complexe IKK (IKKα (A), IKKβ (B) et IKKγ (C)), dont les domaines glu1 de la luciférase de Gaussia princeps sont en partie N-terminale, avec les protéines non structurales du virus Nipah (P, V, W et C) dont les domaines glu2 de la luciférase sont en partie N-terminale. 151

Figure 31 : Modèle d'action de l'héparine sur les Henipavirus et leurs récepteurs EFN-B2 et B3. 156

Figure 32 : Représentation simplifiée de l'activation du promoteur ELAM par les voies de NF-κB (canonique et non canonique) et la voie d'AP1 (Activator protein 1), ainsi que les niveaux d'action supposés des protéines non structurales du virus Nipah dans ces voies... 166

Tableaux

Tableau 1 : Séroprévalence du virus Nipah au sein des espèces de chauves-souris frugivores d'Asie du Sud-est..... 37

Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah chez l'homme d'après (Goh et al, 2000). 50

Tableau 3 : Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque (OMS)(Organisation mondiale de la santé, 2005)..... 64

Tableau 4 : Homologie prédictive des différentes protéines virales entre les souches malaisiennes et bangladaises du virus Nipah (Harcourt et al, 2005)..... 65

Tableau 5 : Pourcentage d'homologie des protéines de l'immunité innée entre l'homme et la souris. 167

Liste des abréviations

AcM	Anticorps monoclonaux
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AP1	Protéine activatrice 1
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messager
BCR	Récepteur des cellules B
CARD	Caspase activation and recruitment domains
CCR	Récepteur aux cytokines CC
CDC	Center for Diseases Control
CDV	Virus de la maladie de Carré
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CS	Chondroitine Sulfate
CXCL	Ligand de la famille CXC
DGR	Règlement sur les matières dangereuses
DS	Dermatane sulfate
DTR	Récepteur à la toxine diphtérique
ECP	Effets cytopathogènes
EFN	Ephrin
ELAM	Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule
ELISA	dosage d'immunoadsorption par enzyme liée
EMEM	Milieu minimum essentiel de Eagle
GAG	Glyco Amino Glycanes
HEK	Human embryonic Kidney
HeV	Virus Hendra
HIV-I	Virus de l'immunodéficience humaine de type I
hRSV	Virus respiratoire syncytial humain
HS	Héparanes Sulfates
HSV-I	Virus de l'Herpès Simplex de type I
IATA	Association internationale du transport aérien
IFNAR	Récepteur à l'interféron alpha
Ig	Immunoglobuline
IKK	Kinase inhibitrice du facteur nucléaire kappa
IL	Interleukine
iLC	Cellules lymphoïdes innées
iNKT	cellules invariant natural killer T
IRF	Interferon Regulatory transcription Factor
ISG	Interferon Stimulated Genes
JAK	Janus Kinase

kDa	kilo Dalton
KO	Knock-Out
LD50	Dose léthale 50%
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology-2
LPS	Lipopolysaccharide
LTi	Cellules inductrice du tissu lymphoïdes
LT-βR	Récepteur aux lymphotoxines Beta
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling *protein*
MCP	Protéine Chemoattractante des Monocytes
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF-κB	Facteur Nucléaire-kappa B
NiV	Virus Nipah
NK	Cellules Natural Killer
NLR	Ratio de Luminescence Normalisé
NOS	Nitric Oxide Synthase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	Pathogène Associated Molecular Pattern
PCA	Test de Complémentation Protéique
PCR	Réaction en chaine par polymérase
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PK/PD	Pharmacocinétique / Pharmacodynamie
PKR	Protéine Kinase R
PMD	Domaine de Multimérisation de la protéine P
PRR	Pathogen Recognition Receptor
qPCR	PCR quantitative
RAG	Gène activant la recombinaison V-D-J
RIG-I	retinoic acid-inducible gene 1
RLU	Relative Luminescence Unit
RT	Transcription inverse
SN	Séroneutralisation
SRAS	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TCR	Récepteur des cellules T
Th	T helper
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
ufp	Unité formant plage
VSV	Virus de la Stomatite Vésiculeuse

Introduction

L'étude des maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes constitue actuellement l'un des enjeux majeurs de santé publique mondiale. En effet, on estime que 70% de ces maladies ont une origine zoonotique. Si l'on compte quelques réémergences bactériennes (Fièvre charbonneuse, *Bacillus anthracis* ; Leptospirose, *Leptospira sp ;* etc…) et parasitaires (Cryptosporidiose, *Cryptosporidium sp. ;* Anisakiase, *Anisakis sp. ;* etc…), les émergences virales représentent la majorité des maladies infectieuses ainsi qualifiées. Parmi celles-ci, on retrouve principalement des virus à ARN, provenant de familles à large spectre d'hôtes. Les virus Nipah et Hendra forment un cas assez particulier à cette règle. Classés dans un genre nouveau de la famille des *Paramyxoviridae*, ces deux Henipavirus (nom formé de la contraction des deux noms) possèdent un spectre d'hôte particulièrement large. En effet, les virus de cette famille bien connue présentent généralement un spectre d'hôtes naturels restreint : les virus de la rougeole et des oreillons pour l'homme, de la maladie de Carré pour les carnivores ou encore de la maladie de Newcastle chez la volaille. Ils ne représentaient pas, à priori, une menace zoonotique majeure jusqu'à la découverte du genre *Henipavirus*.

Etant donné la très haute pathogénicité des virus Nipah et Hendra, et en l'absence de traitement et de prophylaxie adaptés, les autorités internationales ont classé ces agents pathogènes au niveau 4 de biosécurité, le plus haut niveau de confinement existant. L'étude de ces virus n'est donc permise que dans un petit nombre de structures au monde, capables de fournir des conditions de sécurité nécessaires à la protection des scientifiques qui les étudient et des populations environnantes. Le laboratoire P4 Jean Mérieux situé sur le campus de Gerland à Lyon est actuellement le seul laboratoire civil de ce type en France et l'un des plus grands d'Europe. Il nous a fourni l'opportunité exceptionnelle de pouvoir réaliser ce travail.

Partie I. Etude bibliographique sur les Henipavirus

I. Généralités sur les Henipavirus

A. Historique

1. Le virus Hendra

Les 22 et 23 septembre 1994, un cas suspect faisant état d'une maladie respiratoire sévère atypique chez plusieurs chevaux de la banlieue Hendra de Brisbane, en Australie, attire l'attention des services vétérinaires du Queensland. En effet, le propriétaire de ces chevaux est lui aussi atteint des mêmes symptômes et est hospitalisé dans un état critique. A ce moment, rien ne permet d'établir une relation entre la maladie de l'éleveur et celle de ses chevaux mais toutes les étiologies sont envisagées. Les diagnostics effectués permettent d'éliminer rapidement la peste équine, la grippe équine et une infection suraiguë par l'herpès virus équin. Les tests concernant *Pasteurella, Bacillus anthracis, Yersinia, Legionella, Pseudomonas* et *Streptobacillus moniliformis* s'avèrent négatifs ; de même pour ceux concernant l'identification de toxiques comme le paraquat. En revanche, un virus formant des syncytia est détecté sur des cellules Vero après mise en culture de tissus pulmonaires prélevés sur des animaux morts des suites de la maladie (Murray, Rogers, *et al*, 1995). L'isolation puis la caractérisation de ce virus par microscopie électronique permet de mettre en évidence des nucléocapsides similaires à celles des virus de la famille des *Paramyxoviridae*. Les analyses sérologiques et l'absence de réaction d'hémagglutination ne permettent pas d'identifier le virus parmi les *Paramyxoviridae* existants. L'analyse comparative des séquences révèle néanmoins une forte homologie avec les virus du genre *Morbillivirus*. Les analyses phylogénétiques permettent finalement de conclure à l'émergence d'un nouveau virus proche des *Morbillivirus* alors nommé « Morbillivirus de la pneumonie équine » (Murray, Selleck, *et al*, 1995). Il faudra attendre l'année 1998 pour voir apparaitre le nom de virus « Hendra », qui deviendra sa dénomination définitive (Yu *et al*, 1998).

2. Le virus Nipah

Le premier cas documenté d'infection par le virus Nipah a été identifié fin septembre 1998 en Malaisie dans le petit village d'Ampang (District de Kinta). Il fait suite à l'apparition soudaine et simultanée de quelques encéphalites létales parmi les fermiers et leurs familles, ainsi que des symptômes respiratoires et neurologiques largement répandus au sein du cheptel porcin du village (Chua *et al*, 1999). Le virus se dissémine rapidement et atteint les villages d'Ulu Piah et Tambun eux-aussi proches de la ville d'Ipoh (région de Perak) où il sévit jusqu'en février 1999. Parallèlement à cette épidémie, deux autres foyers d'infection apparaissent autour de la ville de Sikamat (région de Negeri Sembilan) entre décembre 1998 et janvier 1999 et de la ville de Bukit Pelandok (région de Negeri Sembilan) entre décembre 1998 et avril 1999. Deux cas sont aussi identifiés pendant cette période dans la région de Selangor (Figure 1).

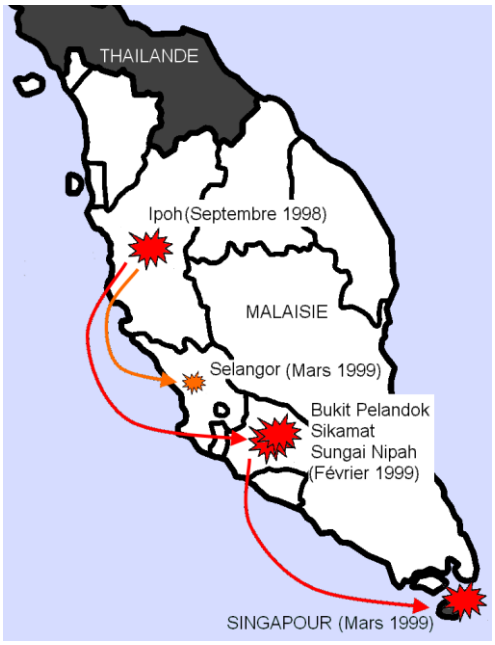


Figure 1 : Localisation des premières épidémies liées au virus Nipah en Malaisie et à Singapour entre septembre 1998 et avril 1999.

Au début des épidémies, les autorités pensaient avoir affaire au virus de l'encéphalite japonaise, assez fréquent dans cette région. Néanmoins, seul un patient sur les 13 premiers cas était positif pour ce virus. Des études de microscopie électronique sur des échantillons de patients infectés permettent alors la mise en évidence de structures virales similaires à celles observées chez les paramyxovirus. C'est par immunohistochimie que les scientifiques malaisiens identifient ce virus comme apparenté au virus Hendra (Anon, 1999). Le virus n'est

isolé qu'en mars 1999 à partir d'un échantillon de système nerveux central humain issu d'un patient décédé et doit son nom à celui du village d'où provenait le patient, Kampung Sungai Nipah (Mohd Nor *et al*, 2000). Le séquençage du virus alors réalisé montre effectivement des similarités avec le virus Hendra, mais il s'agit néanmoins d'un virus tout à fait inconnu. Les virus Hendra et Nipah sont alors classés dans un nouveau genre, les *Henipavirus*, qui représentent un groupe de virus émergents à large spectre d'hôtes au sein de la famille des *Paramyxoviridae*.

S'il a fallu attendre 1999 pour identifier le virus Nipah, son émergence a pu être rétrospectivement datée de 1996 à partir de tissus de porcs morts dans la région d'Ipoh. Il semblerait que l'ensemble des cas malaisiens soient originaires de cet endroit et que le virus se soit disséminé via le transport de porcs d'engraissement infectés. De plus, suite à une erreur initiale de diagnostic, les porcs avaient été vaccinés contre le virus de l'encéphalite japonaise ; la réutilisation des aiguilles et seringues lors de cette vaccination de masse est un des facteurs qui a contribué à la dissémination rapide du virus Nipah (Farrar, 1999). Parallèlement aux épidémies malaisiennes, une autre épidémie est identifiée entre le 9 et le 19 mars 1999 à Singapour parmi 11 employés d'abattoir ayant travaillé sur des porcs malaisiens infectés (Paton *et al*, 1999).

A partir du 20 mars 1999, les autorités malaisiennes décrètent l'arrêt des transports de porcs et leur abattage massif dans un rayon de 10 km autour de chaque ferme infectée (Anon, 1999). Au moment des faits, la péninsule malaisienne comptait 2,4 millions de porcs répartis dans près de 1800 fermes. Au 21 juillet 1999, 1,1 millions de porcs avaient été abattus et 956 fermes entièrement détruites (Mohd Nor *et al*, 2000). Malgré la contrebande liée à de mauvaises compensations pour les éleveurs (Lam, 2003), l'OMS déclare les épidémies malaisiennes et singapourienne terminées en mai 1999. Entre 1998 et 1999, les autorités malaisiennes ont recensé un total de 265 cas humains confirmés dont 105 décès (Chua, 2003) (Figure 2).

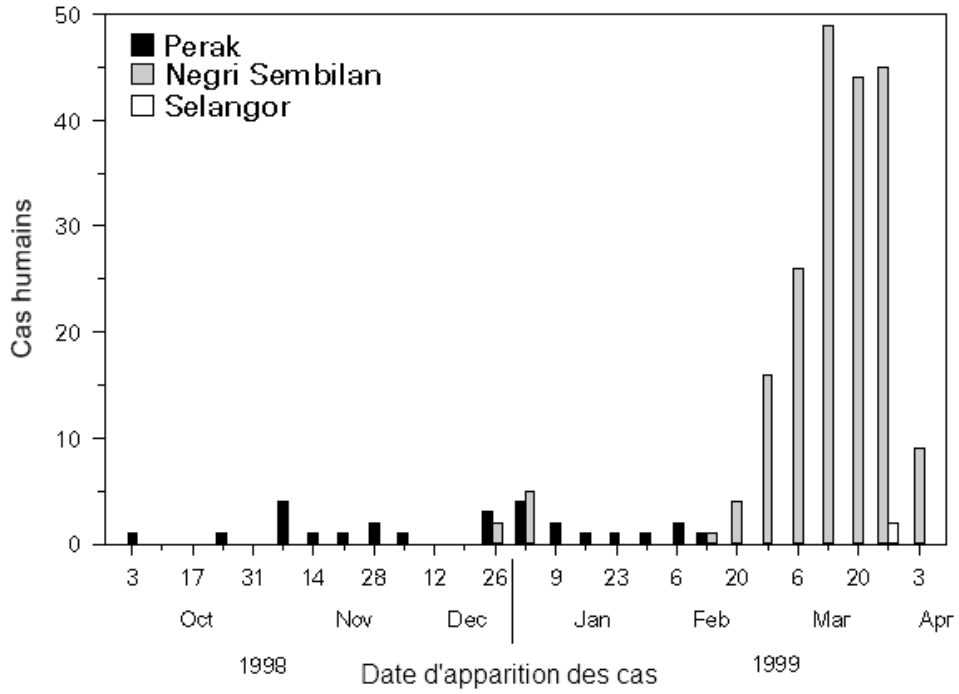


Figure 2 : Chronologie et localisation des cas humains d'infection par le virus Nipah déclarés par les autorités malaisiennes entre octobre 1998 et avril 1999. Adapté à partir de (Anon, 1999).

Alors que l'on pensait avoir contrôlé l'émergence de ce virus en Malaisie et à Singapour, le virus Nipah réapparait en janvier et février 2001 dans la ville de Siliguri en Inde (région du Bengale de l'Ouest) et au Bangladesh (Harit *et al*, 2006; Hsu *et al*, 2004). Les flambées épidémiques ne touchent qu'un petit nombre de personnes (souvent entre 5 et 30) avant de s'éteindre d'elles-mêmes mais ré-émergent chaque année. Ainsi, au Bangladesh, entre la première émergence de 2001 et les épidémies de 2011, on recense une quinzaine d'épidémies majeures ayant fait un total de 111 morts jusqu'en 2010 (Stone, 2011) et 35 morts supplémentaires en 2011.

B. Classification et nomenclature

Les virus Hendra et Nipah forment le genre des *Henipavirus*, de la sous-famille des *Paramyxovirinae*, de la famille des *Paramyxoviridae* de l'ordre des *Mononegavirales (*cf. Figure 3).

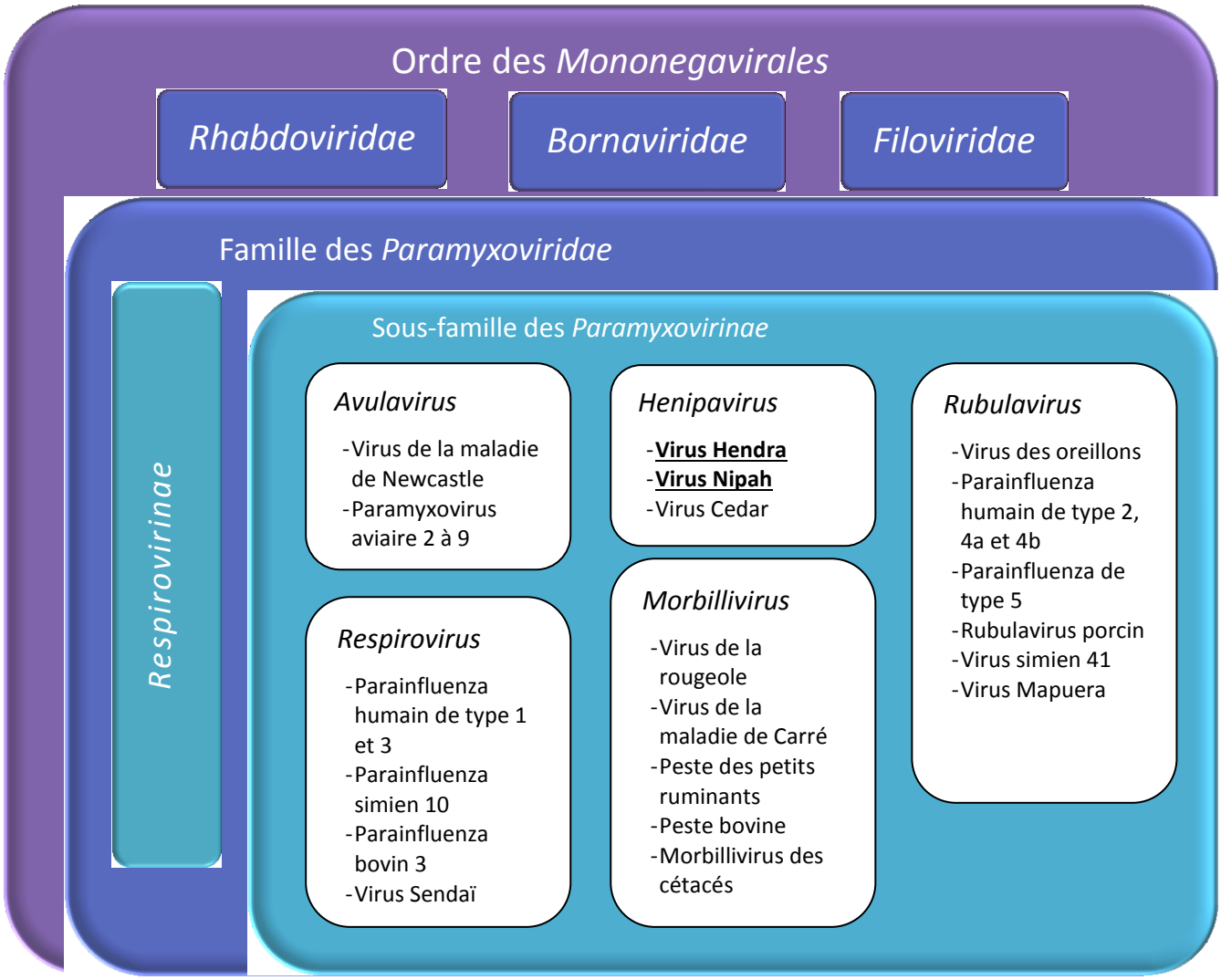


Figure 3 : Classification des Paramyxovirinae d'après le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) (Anon, s. d.).

Les virus de la famille des *Paramyxoviridae* sont généralement connus pour leur spectre d'hôte relativement étroit et une transmission horizontale, directe, généralement par voie aérienne. Habituellement, le site de multiplication primaire de ces virus est le tractus respiratoire. Cependant, il existe un tropisme nerveux pour les virus des genres *Morbillivirus* et *Henipavirus* à l'origine de symptômes neurologiques sévères et parfois retardés comme dans le cas de la panencéphalite sclérosante subaiguë avec le virus de la rougeole ou de l' « encéphalite du vieux chien » avec le virus de la maladie de Carré.

Les virions et la nucléocapside des virus Nipah et Hendra présentent une morphologie caractéristique de la famille des *Paramyxoviridae* et leur organisation génétique ressemble à celle des virus des genres *Morbillivirus* et *Respirovirus*. Cependant, le

genre *Henipavirus* a été créé en 2002 suite à l'impossibilité de regrouper ces deux virus dans l'un des genres déjà existant (Mayo, 2002). En effet, les séquences non traduites en 3' (*leader*) et en 5' (*trailer*) du genre *Henipavirus* sont uniques (Harcourt *et al*, 2000). La taille du génome viral des Henipavirus est plus grande d'environ 2700 nucléotides (soit 15%) par rapport aux autres *Paramyxoviridae* (Harcourt *et al*, 2001). Néanmoins, la taille des protéines (exceptée la protéine P qui est plus longue d'environ 200 acides aminés) est relativement similaire à celle des *Respirovirus* et *Morbillivirus*. Cette incohérence entre la taille du génome et celle des protéines s'explique par la présence de régions non traduites en partie 3' de chaque unité de transcription (à l'exception de L) qui constituent un caractère unique au sein des *Paramyxoviridae* (Eaton *et al*, 2006; Harcourt *et al*, 2001; Mayo, 2002). En 2012, le virus Cedar, isolé à partir de chauve-souris australiennes *Pteropus alecto*, a lui aussi été ajouté dans le genre *Henipavirus*. Ce virus, apparemment non pathogène, possède un génome de taille similaire aux virus Nipah et Hendra (18162 nucléotides) et une homologie de séquence variant de 25 à 60 % selon les protéines virales (Marsh *et al*, 2012). Il semble exister chez les chauves-souris de nombreux autres virus apparentés à la famille des *Paramyxoviridae* et il y fort à penser que leur découverte deviendra de plus en plus fréquente (Drexler *et al*, 2012; Sasaki *et al*, 2012).

C. Caractéristiques structurales et moléculaires des Henipavirus

1. Morphologie

Les Henipavirus sont des virus de type pléiomorphe. Leur forme peut être sphérique ou filamenteuse, et leur taille peut varier d'environ 50 à 150 nm (Chow *et al*, 2000).

Les études de microscopie électronique montrent des images de virions enveloppés dont la surface est bordée par de petites projections d'environ 17 nm (Hyatt *et al*, 2001). La morphologie en chevrons des filaments de nucléocapside (cf. Figure 4), constituée de l'association de la protéine virale N et de l'ARN génomique viral, constitue un élément caractéristique de la famille des *Paramyxovidae.*

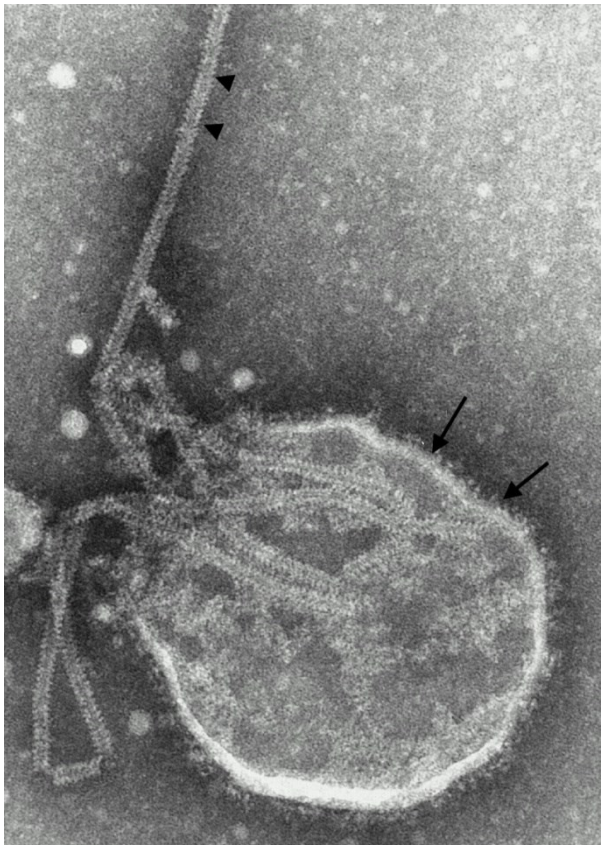


Figure 4 : Image de microscopie électronique du virus Hendra montrant les spicules sur l'enveloppe (flèches) et la nucléocapside en chevrons (triangles). D'après (Halpin et al*, 2000).*

2. Organisation génomique et protéique

a. Les protéines structurales

Le génome des Henipavirus est constitué d'un ARN non segmenté, simple brin, de polarité négative composé de 6 unités de transcription codant 6 protéines structurales majeures (cf. Figure 5).

La protéine de nucléocapside N est longue de 532 acides aminés pour une masse moléculaire de 58 kDa. Lors de sa polymérisation, les protéines N s'organisent en une spirale de chevrons de 18 nm avec une période de 5 nm selon « la règle de 6 » soit 6 nucléotides par unité de N (Ong *et al*, 2009). Cette spirale constitue le squelette protéique de la nucléocapside dans lequel l'ARN viral vient se loger pour limiter sa dégradation. La composition de cette protéine est peu semblable à celles des autres *Paramyxoviridae (*20 à 30% de similarité) mais il existe un domaine de 212 acides aminés (entre l'acide aminé 171 et l'acide aminé 383) relativement bien conservé correspondant à la zone d'interaction avec les protéines P et L. Chez la plupart des *Paramyxoviridae*, la protéine N comporte une

séquence invariante d'une espèce à l'autre F-X_4-Y-P-X_3-S-Y-A-M-G (Fields, 2007, p.1177–1204). On retrouve aussi cette séquence chez les Henipavirus mais la seconde tyrosine est remplacée par une phénylalanine (Wang *et al*, 2001). La protéine N possède aussi des domaines d'interaction lui permettant d'interagir avec elle-même, la phosphoprotéine (P) (Omi-Furutani *et al*, 2010) et la polymérase (L) afin d'optimiser la protection, la réplication et la transcription du virus. Une seule protéine N possède plusieurs sites d'interaction avec la protéine P et il est possible de former des hétérocomplexes NiV N / HeV P et vice-versa (Chan *et al*, 2004). Une de ces interactions entre N et P a été résolue au niveau atomique sur HeV et indique que la partie désorganisée C-terminale de N (N_{TAIL}) interagit avec la partie C-terminale XD de la protéine P pour permettre le recrutement de la polymérase virale. Cette interaction se caractérise par un repliement de l'élément de reconnaissance moléculaire de N_{TAIL} en hélice α lors de son attachement sur une zone hydrophobe à la surface de XD (Communie *et al*, 2013).

La phosphoprotéine P est une protéine de 707 (HeV) / 709 (NiV) acides aminés pour une masse moléculaire théorique de 78 kDa. Par comparaison avec les autres virus de la famille des *Paramyxoviridae*, la protéine P des Henipavirus est plus longue de 100 acides aminés (Wang *et al*, 2001). Elle joue un rôle important dans la stabilisation de la nucléocapside et peut interférer avec la réponse immunitaire innée quand elle se retrouve sous forme libre dans le cytoplasme (Shaw *et al*, 2004). En plus de son domaine X organisé, la protéine P possède un domaine de multimérisation (PMD) qui lui permet de s'organiser sous forme d'une super-hélice extrêmement stable (Blocquel *et al*, 2013) dont la résolution du cristal a permis de conclure à une formation en tétramères (Bruhn *et al*, 2014). La protéine P possède 2 sites de liaison à N, l'un en région N-terminale (acides aminés 3-220) et l'autre en position C-terminale (acides aminés 636-709) (Chan *et al*, 2004).

La protéine de matrice M a une taille de 352 acides aminés et une masse moléculaire calculée d'environ 40 kDa. Elle joue un rôle structural dans l'architecture des virions mais aussi dans leur entrée dans les cellules cibles, leur assemblage (Wang *et al*, 2010) et leur bourgeonnement (Patch *et al*, 2007; Ciancanelli et Basler, 2006). La protéine M des Henipavirus est relativement similaire à celle des autres *Paramyxoviridae* : elle est très basique (Wang *et al*, 2001) et stabilise la protéine F en interagissant avec sa queue cytoplasmique.

La protéine de fusion F compte 546 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 60 kDa. Comme pour l'ensemble des *Paramyxoviridae*, cette protéine est une protéine de fusion de classe I et possède donc deux hélices α, impliquées dans la formation d'une structure trimérique en épingle à cheveux qui se transforme en long faisceau torsadé au cours de la fusion (Bossart *et al*, 2001). Cette protéine est aussi une protéine membranaire de type I avec un domaine C-terminal cytoplasmique et un domaine N-terminal extracellulaire. Elle est d'abord produite sous la forme d'un précurseur F0, qui sera ensuite maturé par clivage en F1/F2 sous l'action de la Cathepsine L (Pager *et al*, 2006). Chez les autres *Paramyxoviridae*, c'est généralement sous l'action Ca^{2+} dépendante de la furine que la protéine F est clivée. Lors de l'interaction de la protéine G avec son récepteur cellulaire et selon un mécanisme pH indépendant, la protéine F subit des modifications structurales à l'origine de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible conduisant à l'infection de la cellule et à la formation des syncytia (Eaton *et al*, 2006).

La glycoprotéine G est une protéine de 602 (NiV) / 604 (HeV) acides aminés d'un poids moléculaire théorique de 67 kDa. C'est la protéine d'attachement du virus. Il s'agit d'une protéine membranaire de classe II (glycoprotéine transmembranaire avec un domaine N-terminal cytoplasmique) qui présente la particularité de n'avoir ni de fonction neuraminidase, ni d'activité hémagglutinine à l'inverse de celle d'un grand nombre de *Paramyxoviridae* (Bossart *et al*, 2001). La protéine G des Henipavirus est organisée sous la forme de tétramères et interagit via sa tête globulaire avec les protéines cellulaires Ephrine B2 (Negrete *et al*, 2005) et Ephrine B3 (Negrete *et al*, 2006) qui sont principalement exprimées à la surface des cellules endothéliales et des neurones. L'analyse par cristallographie de cette interaction a révélé que seuls quelques résidus hydrophobiques de la protéine G jouent un rôle clé et possèdent une forte affinité avec Ephrine B2 et B3 (Bowden *et al*, 2008; Xu *et al*, 2013).

Enfin, la protéine L (large) est la plus grosse protéine du virus Nipah avec 2244 acides aminés soit un poids moléculaire de 257 kDa. Il s'agit d'une ARN polymérase ARN dépendante très similaire à celle des autres *Paramyxoviridae*, excepté la substitution d'un acide aminé dans le motif catalytique très conservé de l'enzyme (GDNQ) qui devient GDNE (Harcourt *et al*, 2001). Elle convertit l'ARN génomique viral (de polarité négative) en ARN messagers coiffés ou en ARN antigénomiques (de polarité positive) qui serviront de matrice

à la formation des nouveaux ARN génomiques. Elle est embarquée à l'intérieur des virions grâce à sa forte affinité pour les protéines N et P.

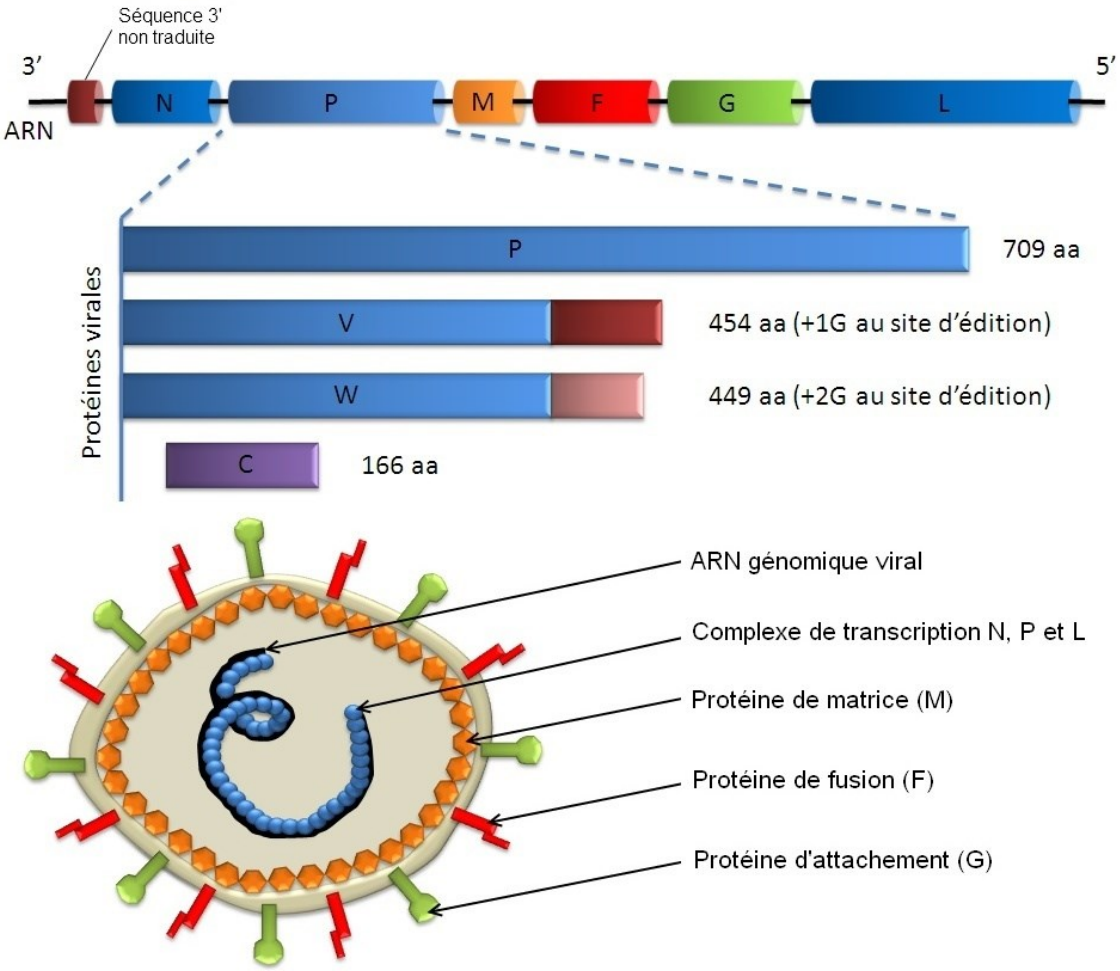


Figure 5 : Organisation génomique du virus Nipah et structure des virions.

b. Les protéines non-structurales

Le gène *p* est capable de coder 3 protéines non-structurales V, W et C (cf. Figure 5). La protéine non structurale C (166 acides aminés) est traduite à partir d'un nouveau codon AUG en aval de celui de P et d'un cadre de lecture différent (+2 nucléotides). Son rôle n'est pas encore clairement identifié chez le virus Nipah, bien que l'on soupçonne son implication dans les mécanismes viraux d'échappement à la réponse immunitaire innée (Yoneda *et al*, 2010; Park *et al*, 2003). Chez les autres Paramyxoviridae, le rôle de la protéine C est un peu mieux connu. On sait, par exemple que la protéine C du virus de la rougeole possède au moins deux rôles facilitant la multiplication virale. D'une part, elle est capable de lever l'inhibition du cycle cellulaire induite par l'entrée du virus dans la cellule par dérégulation de la production de IRF1 (Yokota *et al*, 2011) et d'autre part, elle inhibe les réponses interférons

en empêchant la dimérisation de STAT1 et en altérant la voie d'induction par la PKR (Yokota *et al*, 2011; McAllister *et al*, 2010).

Pendant la transcription du gène P, un ou deux résidus G peuvent être insérés par la polymérase à un site d'édition spécifique. Cette insertion conduit à la synthèse de deux transcrits, traduits en deux nouvelles protéines non structurales V (+1G / 457 acides aminés) et W (+2G / 450 acides aminés). Les protéines P, V et W partagent le même motif N-terminal.

3. Le cycle de réplication viral

L'entrée du virus dans la cellule constitue la première étape du cycle de réplication. Elle est déclenchée par l'interaction entre le récepteur cellulaire Ephrine B2 ou B3 et la protéine virale G. Cette interaction est à l'origine d'une modification conformationnelle qui libère la protéine F et permet la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale (Lee et Ataman, 2011).

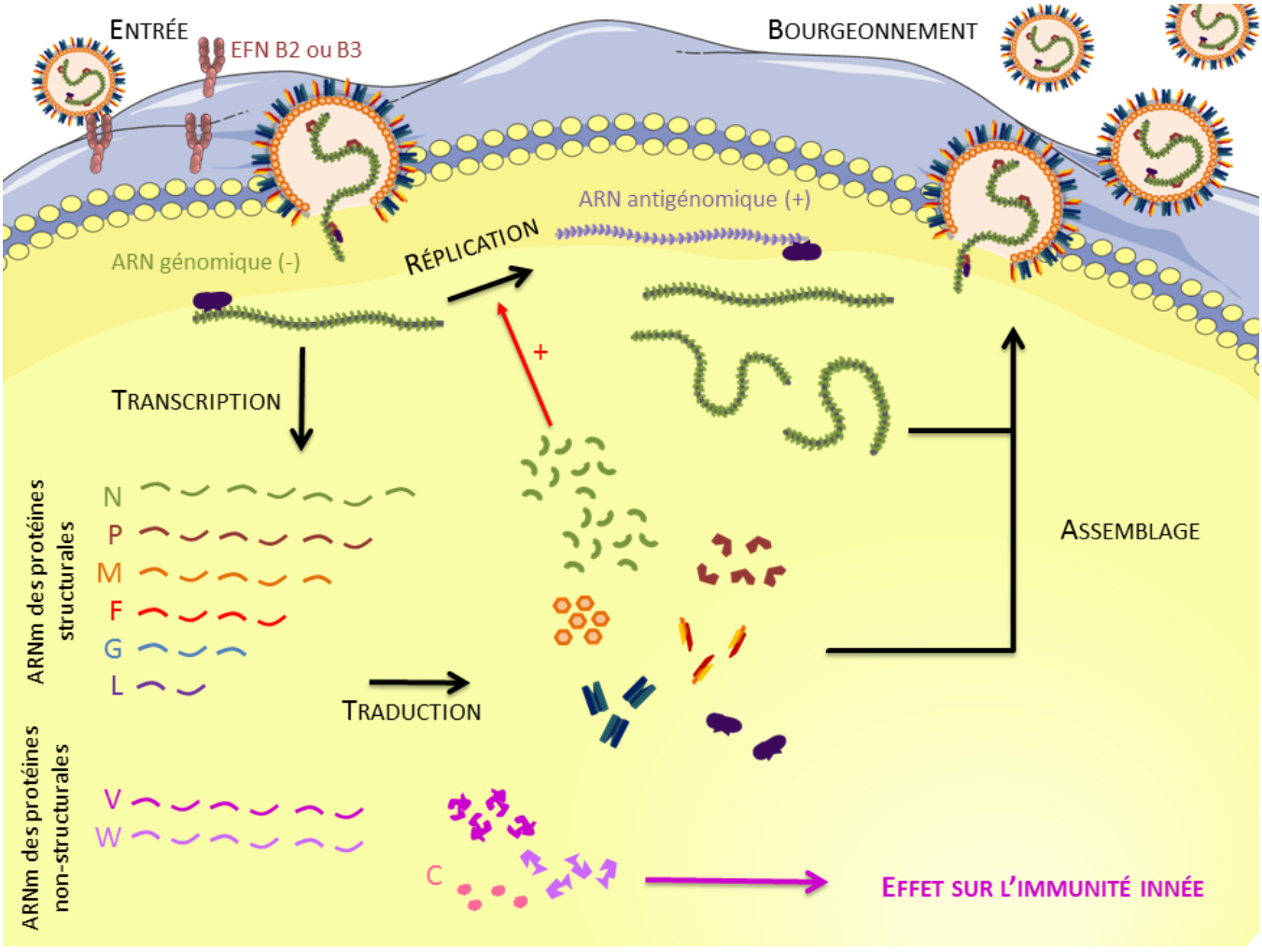


Figure 6 : Cycle de réplication du virus Nipah.

Le virus Nipah est un virus de l'ordre des *Mononegavirales*. Il s'agit donc d'un virus à ARN simple brin de polarité négative. Ainsi, une fois entré dans la cellule, la première étape pour le virus est d'entamer sa réplication. Le virion possède une ARN-polymérase ARN-dépendante (protéine L) qui devient fonctionnelle à l'entrée du virus dans la cellule. Les ARN messagers (ARNm) sont produits selon un gradient résultant d'un phénomène d'atténuation polaire (cf. Figure 6). Ainsi, l'ARN-polymérase commence systématiquement par transcrire l'ARN génomique à partir du premier gène (N) et s'arrête à la première séquence intergénique. La polymérase peut alors se décrocher et se raccrocher à la séquence 3' non traduite ou continuer la transcription du gène suivant. Le phénomène se présente à nouveau à chaque fin de gène. La probabilité de transcrire chaque gène devient donc de plus en plus faible au fur et à mesure que l'on s'écarte de l'extrémité 3'. On retrouve ce mécanisme d'atténuation polaire chez l'ensemble des *Mononegavirales* (Fields, 2007, p.1305–1340). Les séquences non traduites en 3' et en 5' fonctionnent respectivement en tant que promoteurs de la transcription et de la réplication de l'ARN génomique. Elles permettent la régulation de la synthèse des différents composants des virions.

D. Pathogénie

1. Voies d'entrée et dissémination du virus

L'entrée naturelle du virus dans l'organisme se fait majoritairement par voie aérienne mais est aussi possible par voie orale.

Selon un modèle développé récemment (Mathieu *et al*, 2011) (cf. Figure 7), l'infection commencerait dans les cellules dendritiques de l'épithélium respiratoire ou digestif qui constitueraient le site primaire de réplication (1). Les cellules dendritiques infectées migreraient alors vers les organes lymphoïdes drainants par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques (2). Les cellules endothéliales de ces vaisseaux peuvent être infectées à ce moment. Une fois arrivées dans les organes lymphoïdes, les cellules dendritiques infectées produisent des particules infectieuses de virus Nipah qui peuvent s'adsorber sur les nombreux lymphocytes environnants (3). Cette adsorption permettrait au virus d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire et une dissémination rapide dans tout l'organisme via le flux sanguin. Arrivés dans les vaisseaux où le flux est plus faible (particulièrement les capillaires), les lymphocytes interagissent avec l'endothélium vasculaire par un phénomène de « rolling » qui permet un contact très étroit entre le virus

adsorbé et les récepteurs endothéliaux du virus, Ephrine B2 et B3 (4). La multiplication virale s'amplifie alors rapidement et l'infection s'étend aux cellules des muscles lisses entourant la paroi du vaisseau sanguin. La propagation et l'amplification continuent ainsi pour toucher toutes les cellules permissives des organes irrigués (5). Ce modèle permet notamment d'expliquer le passage de la barrière hémato-encéphalique et l'invasion du système nerveux central. En effet, lors de l'infection de l'endothélium des vaisseaux cérébraux, des brèches vasculaires apparaissent suite à la formation des syncytia et de la mort cellulaire qui en résulte. La barrière hémato-encéphalique est donc rompue et le virus peut alors infecter facilement les neurones, hautement sensibles à l'infection.

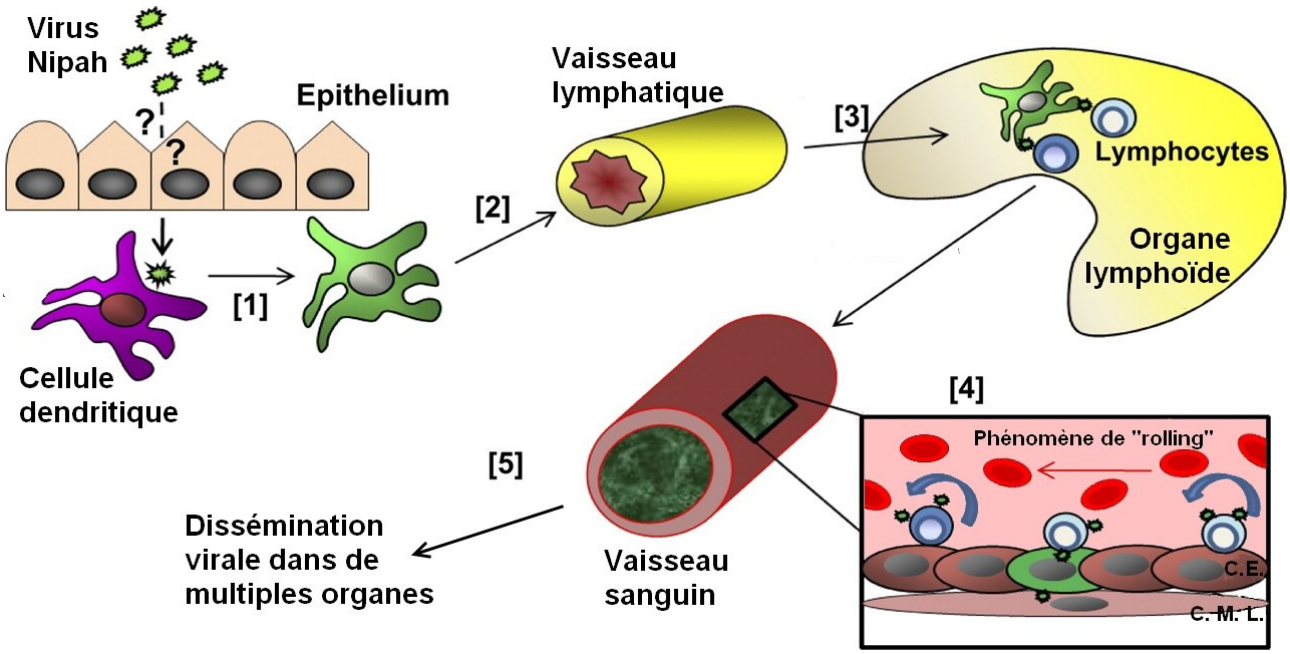


Figure 7 : Modèle de dissémination du virus Nipah utilisant les leucocytes. Légende : C.E. – Cellule endothéliale ; C. M. L. – Cellule musculaire lisse. Adapté de (Mathieu et al*, 2011).*

Néanmoins, à la suite d'une infection périphérique, l'infection du parenchyme cérébral semble aussi possible par un transport axonal rétrograde. Ce mode de dissémination a été mis en évidence chez le porc, dans les axones du nerf olfactif (cf. Figure 8), lors d'études *in vivo* d'infections simultanées par voie intranasale, orale et oculaire (Weingartl *et al*, 2005). Il a été confirmé par la suite chez le hamster doré (Munster *et al*, 2012).

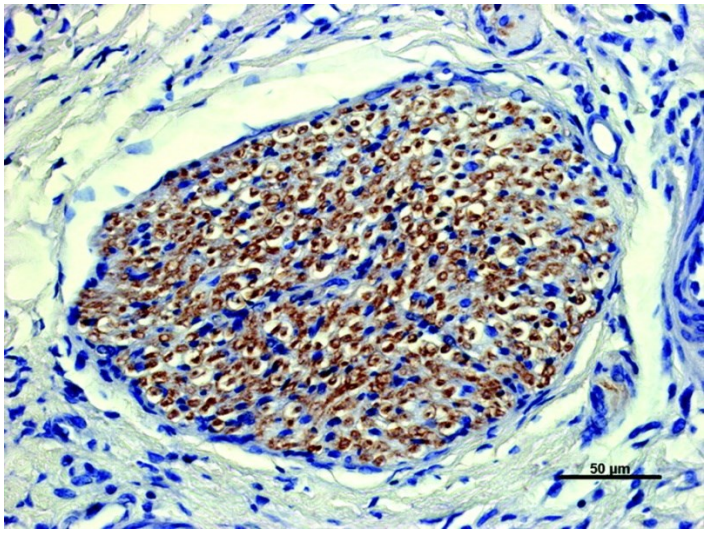


Figure 8 : Immunomarquage positif des antigènes du virus Nipah dans les axones du nerf olfactif. Coupe transversale des cornets nasaux. Tiré de (Weingartl et al*, 2005).*

2. Cellules cibles et récepteurs d'entrée

Les principales cellules touchées par le virus sont les cellules endothéliales et les neurones. Néanmoins, un très grand nombre de types cellulaires peuvent être infectés par les Henipavirus. Ce très large tropisme semble lié à la distribution du récepteur viral : les molécules Ephrine B2 et B3.

La molécule EphrineB2 a été identifiée en 2005 par deux groupes indépendants et selon deux approches différentes comme étant le récepteur nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules cibles (Bonaparte *et al*, 2005; Negrete *et al*, 2005). Cette protéine transmembranaire de 333 acides aminés, appartenant à la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase, permet la transmission bidirectionnelle de signaux. Elle agit donc aussi bien en tant que récepteur ou ligand. Elle est largement exprimée à la surface de l'endothélium et des cellules neuronales et joue un rôle majeur lors du développement embryonnaire précoce en intervenant dans les étapes de neurogenèse (Zimmer *et al*, 2003) et d'angiogenèse (Wang *et al*, 1998). Elle interagit aussi avec le système immunitaire au moment de la diapédèse monocytaire. Ephrine B4, le ligand d'Ephrine B2, est exprimé à la surface des monocytes. L'interaction entre cette molécule et la partie extracellulaire d'Ephrine B2 permet l'attachement des monocytes à la paroi de l'endothélium. La migration à travers l'endothélium est ensuite assurée par la portion intracellulaire d'Ephrine B2 (Pfaff *et al*, 2008). L'Ephrine B2 est une molécule extrêmement conservée au cours de l'évolution, particulièrement dans sa zone d'interaction appelée boucle G-H (Gerlier, 2011). On la

retrouve chez l'ensemble des mammifères et même chez les oiseaux et les poissons. Son expression concerne l'ensemble des grands appareils physiologiques et intervient, à différentes intensités, dans plus de 50 types cellulaires (Anon, s. d.).

L'Ephrine B3, une protéine très exprimée dans les cellules du cerveau et ayant une forte homologie avec l'Ephrine B2, peut aussi constituer un récepteur pour le virus Nipah mais avec une affinité bien moindre (Negrete *et al*, 2006).

3. Interactions avec le système immunitaire inné

Lors d'une infection virale, de nombreux mécanismes de défense sont mis en jeu par la cellule hôte pour inhiber la multiplication virale. La réponse interféron de type 1 constitue l'un des éléments majeurs de cette défense innée. Elle fait intervenir de nombreuses protéines, activées en cascades, et conduit à la synthèse d'interféron et de protéines antivirales. Elle se déroule en deux temps : une première phase de détection du pathogène par différentes protéines puis une seconde phase de signalisation commune, aboutissant à la production d'IFN-I et à son action sur la production d'effecteurs cellulaires anti-viraux.

a. Détection du pathogène

La réponse interféron de type I est une réponse immunitaire innée antivirale déclenchée dans une très large majorité de cellules lors d'une infection par un virus. Elle repose sur la détection de signaux de danger (les Pathogens Associated Molecular Patterns – PAMPs) par des récepteurs cellulaires membranaires ou cytoplasmiques (les Pathogens Recognition Receptors – PRRs). Dans le cas du virus Nipah, les ARN viraux double ou simple brin représentent des PAMPs capables d'activer ces PRRs.

Les Toll-Like Receptors (TLR) sont des PRRs membranaires que l'on retrouve exposé à la surface des cellules ou à l'intérieur des endosomes. Ils sont au nombre de 9 chez l'homme et permettent la détection d'une très grande diversité de PAMPs. Parmi ceux-ci, les TLR 3, 7 et 8 sont capables de détecter les ARN viraux simple brin (cf. Figure 9 A. et B.). Cette détection conduit à l'activation d'une cascade de signalisation via la protéine adaptrice MyD88 (pour tous les TLR sauf TLR3) ou la protéine adaptrice TRIF (pour TLR3 et 4).

Les RLRs (RIG-I-Like Receptors) sont des récepteurs cytoplasmiques possédant un domaine hélicase capable de reconnaitre les ARN double brins. Cette famille est constituée de 3 protéines, RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene I), MDA5 (Melanoma Differentiation-

associated Antigen 5) et LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology 2) (cf. Figure 9 C.). Ils agissent de façon complémentaire à l'intérieur du cytoplasme. Ainsi, RIG-I est capable de reconnaitre de petits ARN double brins 5' triphosphates à bouts francs et MDA5 de grands fragments ARN double brin triphosphates. Le rôle de LGP2 est encore mal connu mais il semble agir en tant que régulateur de la voie des RLRs. Une fois activés, les RLR sont capables d'interagir avec la protéine MAVS (Mitochondrial Anti Viral Signaling) qui va servir d'adapteur et va pouvoir transduire le signal le long d'une cascade de signalisation.

Les cascades de signalisation conduites par MyD88, TRIF et MAVS aboutissent à l'activation des facteurs de transcription IRF3, IRF7, NFκB et AP1. Suite à leur translocation dans le noyau, ces facteurs vont pouvoir induire la production d'IFN-I. La réponse interféron s'organise alors au niveau tissulaire par un système d'auto-amplification et d'activation des cellules voisines par l'intermédiaire du récepteur IFNAR.

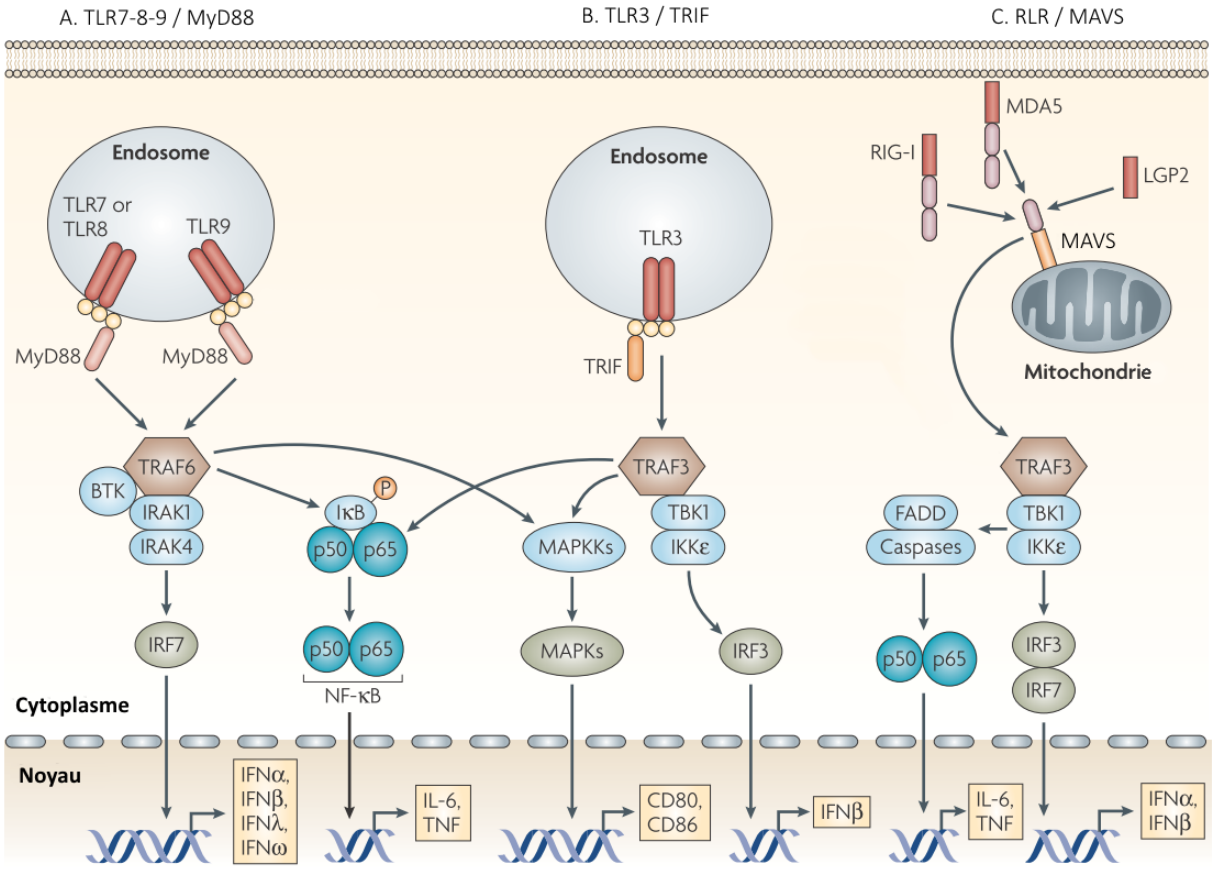


Figure 9 : Détection des acides nucléiques viraux et voies de signalisation associées. D'après (Gilliet et al*, 2008).*

b. Signalisation de la voie IFN-I

L'interféron ainsi produit suite à la détection du pathogène est libéré par la cellule dans le milieu extracellulaire. Il active alors les récepteurs IFNAR des cellules environnantes qui vont, à leur tour, entrainer une cascade de signalisation via les protéines JAK1 (Janus Kinase) et TYK2 (Tyrosine Kinase) aboutissant à la dimérisation des facteurs STAT1 et STAT2. Ce dimère est ensuite exporté dans le noyau de la cellule où il active les ISG (Interferon Stimulated Genes). Ces gènes conduisent enfin à la synthèse de protéines antivirales qui vont protéger la cellule contre une infection virale (cf. Figure 10 B).

c. Mécanismes d'échappement viral

Les protéines P, V et W des *Paramyxoviridae* participent à l'échappement immunitaire viral en inhibant à la fois la synthèse de l'interféron (cf. Figure 10 A) et son action (cf. Figure 10 B). L'action de la protéine V du virus Nipah sur la détection de l'ARN viral double brin par MDA5 est identique à celle des protéines V des autres *Paramyxoviridae* (Eaton *et al*, 2006). Les protéines non-structurales P, V et W du virus Nipah utilisent néanmoins des mécanismes tout à fait originaux. Par exemple, la protéine W du virus Nipah agit à l'intérieur du noyau, en fin de cascade, et permet donc d'abolir à la fois la voie MDA5 et la voie des TLRs (Shaw *et al*, 2005) (cf. Figure 10 A.).

Les protéines V et W des Henipavirus jouent aussi un rôle dans la voie de signalisation sous IFNAR. En effet, la protéine V est capable d'empêcher la phosphorylation des dimères de STAT1/STAT2 et de les agglomérer en complexes de haut poids moléculaires séquestrés dans le cytoplasme (cf. Figure 10 B.), rendant la signalisation parfaitement inefficace. La protéine W présente ici aussi un mécanisme tout à fait original en bloquant le retour de STAT1 du noyau vers le cytoplasme (cf. Figure 10 B.). Ce mécanisme agit de façon conjointe avec celui de la protéine V dans le cytoplasme et produit un effet synergique important.

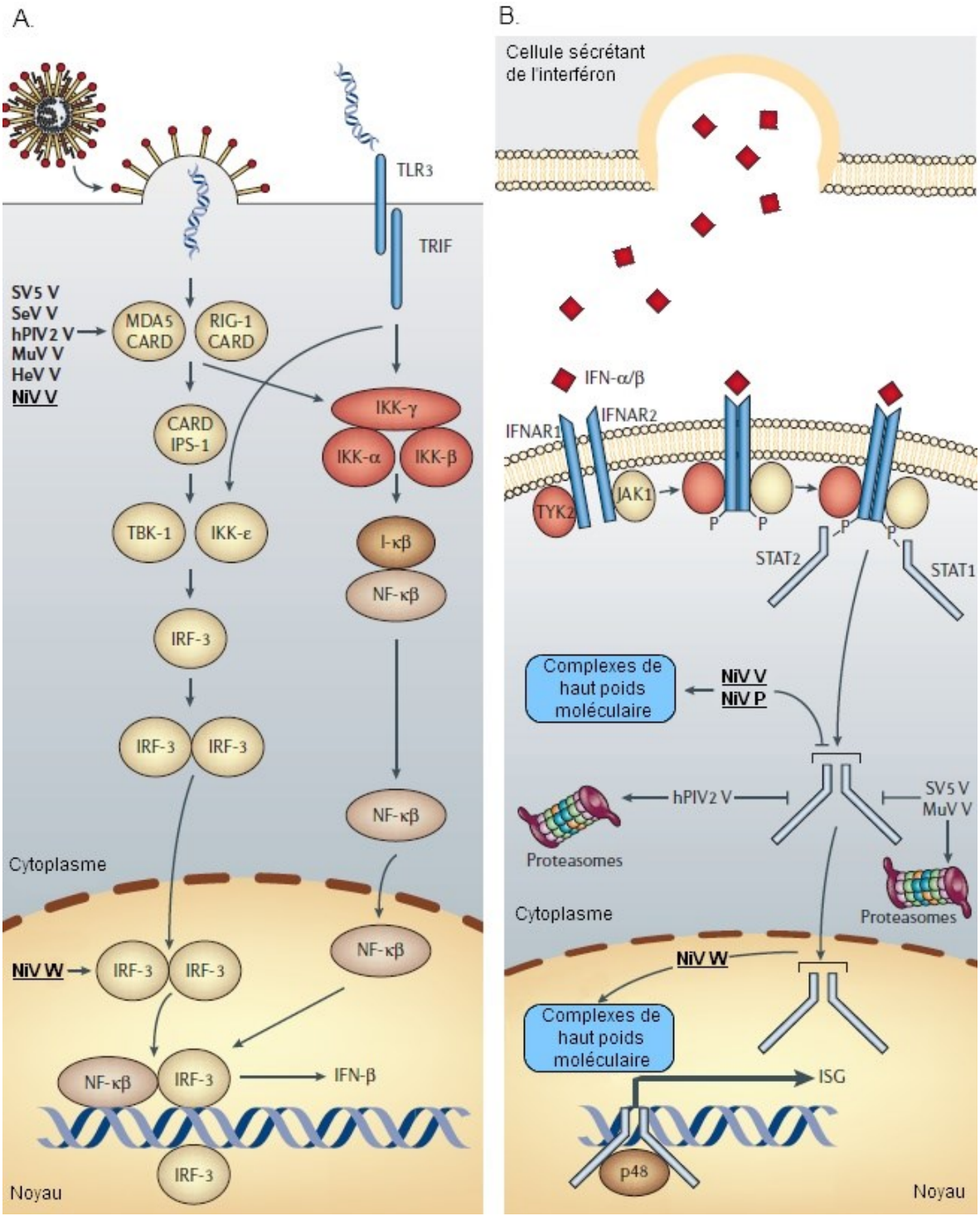


Figure 10 : Voies d'inhibition de la réponse interféron par les protéines non structurales des Paramyxoviridae. Adapté de (Eaton et al*, 2006).*

II. Epidémiologie

A. Espèces cibles

1. Les chauves-souris

Les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* sont identifiées depuis 1996 comme réservoir du virus Hendra (Young *et al*, 1996). Etant donné la forte ressemblance entre le virus Hendra et le virus Nipah, l'hypothèse d'un réservoir chauve-souris commun a rapidement été envisagée (Enserink, 2000). L'implication des chauves-souris frugivores en tant que réservoir sauvage du virus Nipah a été clairement démontrée en 2001 (Yob *et al*, 2001). Mieux encore, le caractère saisonnier du virus Nipah a pu être corrélé au niveau d'excrétion du virus par les chauves-souris (Wacharapluesadee *et al*, 2010) et semble aussi être lié à leur période de reproduction. Des études plus récentes sur la circulation de Hendra en Australie suggèrent néanmoins que le virus circule de façon permanente et endémique au sein des populations de chauves-souris (Breed *et al*, 2011; Field *et al*, 2011). Les études de séroprévalence conduites auprès des différentes espèces de chauves-souris frugivores d'Asie du Sud-est ont permis d'identifier les espèces suivantes comme réservoirs du virus Nipah (cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Séroprévalence du virus Nipah au sein des espèces de chauves-souris frugivores d'Asie du Sud-est.

Espèce	Séroprévalence
Pteropus giganteus	63 % (Epstein *et al*, 2008)
Pteropus hypomelanus	31 % (Yob *et al*, 2001)
Pteropus vampyrus	17 % (Yob *et al*, 2001)
Pteropus lylei	10,9 % (Reynes *et al*, 2005)
Eonycteris spelaea	5 % (Yob *et al*, 2001)
Cynopterus brachyotis	4 % (Yob *et al*, 2001)

Récemment, l'étude de l'émergence du virus Nipah à partir du réservoir chauve-souris a fait l'objet d'études originales basées sur une approche sociale et environnementale. Les chercheurs du Groupe de Recherche sur l'Ecologie des *Henipavirus* (HERG) ont pu mettre en évidence le caractère décisif de différents facteurs conduisant à l'émergence du virus. Parmi ces facteurs, l'intensification agricole a joué un rôle majeur. En effet, l'augmentation des terres agricoles au détriment de l'habitat naturel des chauves-

souris ainsi que la double utilisation de ces terres, à la fois pour la culture d'arbres fruitiers et l'élevage, ont produit un contexte favorable au franchissement de la barrière d'espèce et à l'émergence du virus Nipah (Pulliam *et al*, 2011). D'autres études ont pu montrer que la composition du paysage était un facteur prédictif de risque. Ainsi, les villages à forte densité de population, à la forêt morcelée et comprenant des arbres des espèces *Polyalthia longifolia* ou *Bombax ceiba* étaient plus à risque que les autres (Hahn *et al*, 2014). Ce type d'études interdisciplinaires apporte une information de grande valeur et permet une ouverture d'esprit essentielle à l'avancée des connaissances scientifiques sur le virus.

Les études en laboratoire apparaissent néanmoins comme indispensables pour une compréhension fine de la pathologie associée à l'infection par le virus Nipah. Bien qu'elle héberge le virus, la chauve-souris ne semble présenter aucun signe clinique associé à l'infection. Cette infection subclinique est cependant caractérisée par la présence transitoire de virus dans certains viscères (notamment reins et utérus), une excrétion transitoire de virus (urine) et une séroconversion (Middleton *et al*, 2007).

Figure 11 : Colonie de Pteropus giganteus au Sri-Lanka. Photo de Bernard Gagnon.

L'infection cible particulièrement les organes du tractus urinaire (néphrite interstitielle, œdème vésical, pétéchies sur la paroi vésicale) et le foie (hépatite), tel que démontré par histologie. L'excrétion urinaire du virus est possible même après séroconversion et semble être à l'origine d'une transmission horizontale suffisante pour

maintenir le virus. Les colonies de chauves-souris contiennent des milliers d'individus et l'air environnant est rempli de microgouttelettes d'urine en suspension aérosol (cf. Figure 11). La pratique de la toilette mutuelle, particulièrement au moment de la parturition, et l'utilisation de l'urine en tant que liquide d'aide au nettoyage (Hall, 2000) facilite les infections par contact direct. Une transmission verticale ou pseudo-verticale est aussi envisagée et cohérente avec les périodes d'épidémie. Par ailleurs, des études montrent la présence du virus Hendra dans des tissus placentaires et des fœtus issus de chauves-souris infectées (Halpin *et al*, 2000; Williamson *et al*, 2000). Un raisonnement par analogie sur le virus Nipah semble relativement cohérent.

2. Les chevaux

Le cheval est l'espèce chez qui le virus Hendra a été isolé pour la première fois en 1994 (Murray, Selleck, *et al*, 1995). En 20 ans, on recense un peu plus de 75 cas d'infections équines par le virus Hendra (Wang *et al*, 2013). Ces évènements sont apparus de façons sporadique mais régulière, avec des cas quasiment chaque années, depuis son émergence en 1994. Les mesures drastiques (mise en quarantaine de l'élevage avec périmètre de sécurité associé à l'abattage systématique du cheptel) prises par les autorités de santé publique australiennes ont permis jusqu'à présent de limiter la contamination de façon efficace. Néanmoins, l'opinion publique s'est beaucoup émue et inquiétée de ces mesures au point que certains députés aient proposés de légiférer sur l'abattage massif des chauves-souris !

3. Les porcs

Le porc a été le premier animal identifié comme étant à l'origine des cas humains d'infection par le virus Nipah (Chua *et al*, 1999). Les premières enquêtes épidémiologiques menées en Malaisie et à Singapour ont permis de mettre en évidence une diffusion extrêmement rapide du virus au sein des cheptels par voie aérosol (confirmée par la suite en laboratoire (Middleton *et al*, 2002)) avec une morbidité proche de 100 % et un grand nombre d'infections asymptomatiques (Lam, 2003). La létalité est en revanche assez faible, de l'ordre de 1 à 5 %. Les signes cliniques sont majoritairement respiratoires avec une toux marquée faisant penser à un aboiement, parfois accompagnée de troubles neurologiques conduisant à une mort subite. Les études histologiques mettent principalement en évidence des anomalies pulmonaires incluant pneumonie interstitielle, hémorragies, formation de

syncytia parmi les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires et vascularite généralisée. L'immunohistochimie permet d'identifier le virus en grande quantité dans les épithéliums pulmonaires (Mohd Nor *et al*, 2000). Ceci suggère une excrétion nasale, en parfaite cohérence avec l'implication majeure d'une contamination aérosol démontrée expérimentalement.

L'infection initiale des porcs s'est vraisemblablement produite par contact aérosol avec de l'urine ou des fèces de chauves-souris infectées (Field *et al*, 2001). La voie de contamination orale par les fèces ou par l'ingestion de chauves-souris mortes semble possible bien que moins efficace (Middleton *et al*, 2002). Les densités de populations porcines sont extrêmement élevées dans ces régions et l'épizootie s'est propagée rapidement de ferme en ferme par le transport et l'échange d'animaux vivants (notamment pour les saillies) ainsi que la réutilisation de seringues lors des campagnes de vaccination (Mohd Nor *et al*, 2000).

4. Les hommes

Ce sont les cas humains qui ont fait prendre conscience de l'émergence du virus Nipah. La morbidité est relativement faible et lors de la plus grosse épidémie, en 1998-1999 en Malaisie, seulement 265 cas ont été rapportés dont 105 décès (Chua, 2003). Lors de cette épidémie, le taux de létalité immédiat varie entre 32 % (Goh *et al*, 2000) et 41 % (Chong *et al*, 2002). Le taux de rechute est estimé à 7,5 % et le taux d'apparition retardée à 3,4 % (Tan et Wong, 2003). On note que 15 % (Goh *et al*, 2000) à 19 % (Chong *et al*, 2002) des patients ayant survécu présentent des séquelles neurologiques. Le taux de survie à long terme et sans séquelle est donc situé autour de 40 %.

Au Bangladesh et en Inde, les données épidémiologiques sont un peu différentes avec un taux de létalité beaucoup plus élevé, autour de 73 % (variant entre 33 % et 100 % selon les épidémies) (Chong *et al*, 2008). Le type de population touché varie aussi en fonction des souches. En Malaisie, les patients sont des adultes mâles, en apparente bonne santé (Goh *et al*, 2000), alors qu'au Bangladesh et en Inde, les patients sont principalement des jeunes enfants ou des personnes âgées (Hossain *et al*, 2008). Les épidémies sont récurrentes depuis 2001, mais ne touchent qu'un faible nombre de personnes chaque année. On recense un peu plus de 200 personnes atteintes en 10 ans, avec un total de 146

morts à l'été 2011. La proportion de patients présentant des séquelles neurologiques n'est pas significativement différente de celle observée en Malaisie (Sejvar *et al*, 2007).

Les modalités de transmission ainsi que les signes cliniques et lésions associées à l'infection par le virus Nipah seront détaillées ultérieurement (cf. C et III).

Concernant Hendra, peu de données sont présentes chez l'homme car seulement 4 cas mortels ont été recensés entre 1994 et 2014.

5. Les animaux domestiques

Les animaux domestiques ont été envisagés comme réservoirs et hôtes intermédiaires des Henipavirus. En plus d'avoir pu jouer un rôle mécanique dans la diffusion du virus de ferme en ferme, les carnivores domestiques et sauvages semblent aussi susceptibles à l'infection par ces virus.

Les chiens ne s'avèrent cependant pas très sensibles à l'infection par le virus Nipah et on ne recense qu'un très faible nombre de cas de séroconversion (4 animaux positifs sur les 249 testés à travers le pays (Mills *et al*, 2009) bien qu'une autre étude avec un échantillonnage réalisé aux environs des fermes infectées renvoie 42 échantillons positifs sur les 92 testés (Yob *et al*, 2001)). L'immunohistochimie a permis de mettre en évidence l'infection de deux chiens retrouvés moribonds aux alentours des fermes infectées. Ces chiens présentaient des signes cliniques et des lésions relativement similaires à ceux de la maladie de Carré incluant fièvre et détresse respiratoire associées à un œdème pulmonaire, une pneumonie interstitielle, une méningite non-suppurée et de nombreuses pétéchies (Hooper *et al*, 2001). Quelques cas ont aussi été recensés dans les foyers infectieux à HeV avec des symptômes similaires (Anon, 2011).

Les chats peuvent aussi être infectés (Mohd Nor *et al*, 2000) bien que l'évènement soit très rare dans la nature (Epstein *et al*, 2006) (un seul cas naturel recensé). Expérimentalement, le chat est un bon modèle pour les symptômes respiratoires (Middleton *et al*, 2002; Mungall *et al*, 2006) liés à l'infection par le virus Nipah. Les lésions recensées incluent des pétéchies sur la plèvre viscérale, une bronchiolite et une alvéolite aiguë, un œdème inflammatoire de la séreuse vésicale et de nombreuses hémorragies diffuses. Le virus a pu être mis en évidence dans la plupart de ces tissus par immunohistochimie et RT-qPCR (Mungall *et al*, 2006). La transmission verticale et la réplication virale chez le fœtus ont

été démontrées avec un niveau de réplication fœtal similaire à celui observé chez l'adulte (Mungall *et al*, 2007). Cette découverte fait du chat un excellent modèle pour étudier la transmission verticale susceptible d'avoir lieu chez la chauve-souris.

Parmi les herbivores, on ne recense qu'un seul cas équin confirmé par immunohistochimie. Seul le système nerveux central était atteint et présentait des lésions de méningite non-suppurative associées à une infiltration leucocytaire du parenchyme cérébral, particulièrement en périphérie des vaisseaux sanguins (Hooper *et al*, 2001). Des études sérologiques ont aussi permis de mettre en évidence l'infection de deux poneys hébergés dans la zone d'épidémie malaisienne (Chua *et al*, 2000). Les études sérologiques doivent cependant être considérées avec circonspection car elles peuvent donner des résultats faux-positifs. Le cas s'est d'ailleurs produit en mai 2011 où 4 chevaux de course ont été bloqués à Singapour pendant plusieurs semaines avant confirmation du résultat faux-positif par séroneutralisation. Les chèvres semblent aussi susceptibles à l'infection par le virus Nipah (Luby *et al*, 2009; Mohd Nor *et al*, 2000), bien qu'aucune donnée immunohistochimique ou sérologique ne soit disponible pour confirmer ce fait. Bien que le contact avec des bovins malades soit identifié dans une étude épidémiologique cas-témoin comme facteur de risque statistiquement significatif, aucun cas clinique de bovin n'a été recensé (Hsu *et al*, 2004).

Les rongeurs sont la source de nombreuses zoonoses virales et bactériennes. Leur rôle dans la diffusion du virus Nipah a donc très rapidement été envisagé. Néanmoins, toutes les études réalisées sur les rongeurs situés à proximité des zones d'infection sont formelles : les rongeurs locaux (souris, rats, musaraignes, …) ne sont pas susceptibles à l'infection par le virus Nipah (Hsu *et al*, 2004; Yob *et al*, 2001). En 2012, un virus proche des Henipavirus, présentant une homologie nucléotidique variant entre 36,6 et 63,4 % selon les protéines virales, a été identifié en Chine sur des écouvillons rectaux de rats (Wu *et al*, 2014). Ceci constitue la première preuve d'un réservoir rongeur pour un virus proches des Henipavirus.

6. Les modèles animaux expérimentaux

Le recours à des modèles animaux expérimentaux pour étudier la physiopathologie de l'infection par les Henipavirus est indispensable. L'utilisation de ces modèles animaux doit aussi être compatible avec le travail et les infrastructures de niveau P4. A l'heure actuelle, seul l'Australie et l'Allemagne possèdent un laboratoire suffisamment grand pour étudier

des cohortes de chevaux, porcs ou chauves-souris. Le développement de modèles de plus petite taille constitue donc un enjeu majeur de la recherche sur le virus Nipah. La pathologie associée à chacun de ces modèles animaux sera détaillée ultérieurement (cf. Partie IV - I)

Le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) a été le premier modèle animal de petite taille validé pour les études de pathologie (Wong *et al*, 2003). Il développe des signes cliniques neurologiques et systémiques. Il est extrêmement sensible à l'infection et les lésions observées ressemblent à celles observées chez l'homme (encéphalite, vascularite, hémorragies, infiltrations leucocytaires, …).

Le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) est un modèle alternatif au hamster doré. Cependant, il est beaucoup moins sensible et les signes cliniques sont essentiellement neurologiques. Il ne constitue donc pas un très bon modèle d'étude pour le virus Nipah (Weingartl *et al*, 2009). Les lésions observées sont en revanche assez claires et ont fait l'objet d'une étude assez développée (Torres-Velez *et al*, 2008). Une transmission verticale pour le virus Hendra a été démontrée chez cette espèce (Williamson *et al*, 2000) mais n'a jamais été étudiée avec le virus Nipah.

Le furet (*Mustela putorius furo*) est un modèle animal largement utilisé pour les infections respiratoires et constitue l'un des meilleurs modèles d'étude pour le virus influenza. L'infection par le virus Nipah est possible par voie nasale et se révèle très efficace, mimant ainsi assez bien une infection naturelle. Les signes cliniques sont principalement respiratoires mais certains individus développent des signes neurologiques. Les lésions observées sont principalement de type hémorragique (pétéchies sur le parenchyme pulmonaire, les reins et la cavité abdominale, hémorragies sous-cutanées diffuses) et systémique (vascularite, œdème). L'organe le plus sévèrement touché est le poumon où l'on observe une alvéolite nécrotique importante associée à une très forte inflammation (Bossart *et al*, 2009).

De façon anecdotique, l'embryon de poulet a été utilisé pour caractériser les effets physiopathologiques de l'infection par le virus Nipah (Tanimura *et al*, 2006). Ce modèle a permis de confirmer le tropisme endothélial du virus et les organes touchés, à savoir le cœur, le cerveau, les reins, la rate et certains épithéliums. Néanmoins, il n'apporte pas vraiment d'informations nouvelles et originales.

En 2010, deux modèles primates non humains ont été développés en parallèle ; l'un sur le singe vert africain ou grivet (*Chlorocebus aethiops*) (Rockx *et al*, 2010; Geisbert *et al*, 2010) et l'autre sur le saïmiri (*Saimiri sciureus*) (Marianneau *et al*, 2010). Il s'agit pour l'instant des meilleurs modèles animaux existant pour l'étude de la physiopathologie du virus Nipah, mais leur utilisation doit être strictement justifiée et réduite à son minimum. L'emploi de ce modèle sera donc particulièrement envisagé pour les études finales d'efficacité de potentiels traitements prophylactiques et thérapeutiques. Les voies d'infection, les symptômes, leur durée et le taux de survie sont cohérents avec ceux observés chez l'homme. Ces études ont ainsi démontré la possibilité d'infection par voie orale (Geisbert *et al*, 2010). Les lésions observées sont principalement de type hémorragique dans les poumons, les méninges et le cerveau. Le virus et des formations syncytiales endothéliales peuvent être mis en évidence dans une très large majorité des organes.

B. Aire de répartition géographique

Les chauves-souris frugivores de la famille des *Pteropodidae* couvrent une très large surface du globe incluant l'Asie du Sud-est, l'Océanie, l'Afrique sub-saharienne et, de façon anecdotique, l'île de Chypre (source OMS). En tant que réservoir sauvage et sachant que ces chauves-souris sont capables de couvrir de très longues distances (Field *et al*, 2001), l'étude de la séroprévalence des Henipavirus chez ces animaux, sur l'ensemble de leur aire de répartition, constitue un enjeu majeur de détection précoce d'un potentiel évènement épidémique.

Entre 2007 et 2012, des études ont montré l'existence de chauves-souris séropositives pour le virus Nipah en Afrique de l'Ouest, au large du Gabon (Peel *et al*, 2012), au Ghana (Hayman *et al*, 2008) et à Madagascar (Iehle *et al*, 2007) (cf. Figure 12). Il s'agit d'une autre espèce de chauve-souris frugivore du genre *Eidolon* : *Eidolon helvum* et *Eidolon dupreanum*. De même, des porcs ont aussi été diagnostiqués séropositifs dans ces zones (Hayman *et al*, 2011), suggérant une circulation de virus phylogénétiquement proches des Henipavirus conventionnels. Ces découvertes étendent la zone d'endémicité potentielle des Henipavirus même si aucun cas humain n'a été recensé à ce jour en Afrique.

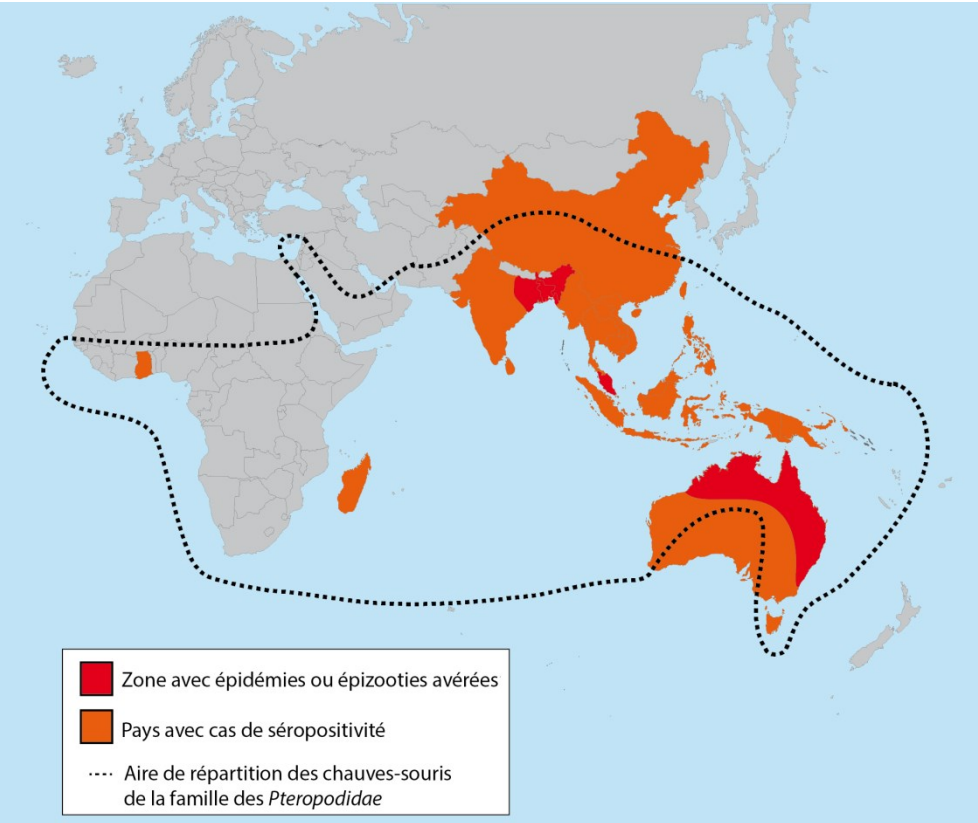


Figure 12 : Répartition géographique des foyers infectieux à Henipavirus et des chauves-souris frugivores de la famille des Pteropodidae.

C. Transmission à l'homme

1. Transmission par aérosols

La transmission par aérosols constitue le premier mode de transmission identifié pour le virus Nipah. Ce type de transmission, via les excrétions et fluides respiratoires des porcs, a d'ailleurs été le seul incriminé dans l'épidémie de Malaisie et Singapour en 1998-1999 (Premalatha *et al*, 2000; Chew *et al*, 2000). En Inde et au Bangladesh, où le porc ne semble pas jouer un rôle aussi important (principalement pour des raisons culturelles et d'organisation de filière), c'est une transmission par aérosols interhumaine qui a pu être identifiée (Gurley *et al*, 2007).

2. Transmission porcine et équine

La transmission des chauves-souris aux porcs du virus Nipah semble se faire par voie oronasale, bien que la voie orale semble moins efficace que la voie nasale (Middleton *et al*, 2002). Les deux modes de contamination envisagés incluent : d'une part, le contact direct de la muqueuse respiratoire avec des gouttelettes d'urine infectée, en suspension ou par fouissage ; d'autre part l'ingestion de fruits contaminés par de la salive et tombés à terre ou

l'ingestion de cadavres de chauves-souris. La première hypothèse semble la plus probable. La transmission entre porcs se fait très certainement uniquement par voie nasale, via les excrétions oropharyngées (Middleton *et al*, 2002). Cette transmission est renforcée par le comportement social du porc et la forte toux provoquée par l'infection.

La transmission du porc à l'homme se fait exclusivement par voie aérosol et par contact direct avec les fluides respiratoires. Les premiers cas identifiés en Malaisie portent à 93 % sur des éleveurs de porcs ou leur famille (Goh *et al*, 2000). Les cas singapouriens concernent uniquement des travailleurs d'abattoirs exposés, ante ou post-mortem, aux fluides respiratoires et à l'urine de porcs malaisiens malades (Paton *et al*, 1999; Chew *et al*, 2000). Des résultats similaires ont été obtenus dans une enquête auprès d'abattoirs malaisiens (Sahani *et al*, 2001) ou auprès du personnel militaire employé pour l'abattage massif en Malaisie (Ali *et al*, 2001). Ces deux études confirment la nécessité d'un contact proche entre l'homme et l'animal pour une infection productive.

Les études portant sur le virus Hendra arrivent à des conclusions similaires quant à la contamination des chevaux par les chauves-souris et la transmission du virus chez l'Homme (Playford *et al*, 2010).

3. Transmission interhumaine

Si la transmission interhumaine du virus Nipah est suspectée dès l'épidémie bangladaise de 2001 (Chadha *et al*, 2006) puis à nouveau en 2004 (Montgomery *et al*, 2008), son existence est formellement acceptée en 2007 (Homaira *et al*, 2010). Les études épidémiologiques des évènements malaisiens n'avaient révélé aucun cas de transmission interhumaine. Nonobstant, il semble que, malgré sa proximité phylogénétique (cf. Partie I.VI.C.), la souche bangladaise soit tout à fait différente sur ce point. Ce mode de transmission est renforcé par les normes sociales du Bangladesh qui imposent aux familles de prendre soin de leurs malades elles-mêmes. Les personnels hospitaliers sont d'ailleurs très réticents à s'occuper des soins quotidiens aux malades. Ce contexte augmente considérablement le risque de transmission aux familles, qui procurent des soins sans formation aux règles d'hygiène ni protection. Le caractère « divin » de la maladie intervient aussi beaucoup dans sa propagation. En effet, plusieurs familles ont fait appel à des guérisseurs spirituels et fakirs qui ont rapidement associé les épidémies de virus Nipah avec l'intervention de démons venus pour punir les villageois de leurs péchés. Les traitements

proposés par leurs soins prennent généralement la forme de cérémonie avec massages à l'huile sacrée, application de pâtes à base de plantes et prières, où toute la famille voire le village est convié, favorisant la contamination par le malade (Blum *et al*, 2009). Une chaine de transmission de la maladie, faisant intervenir un dignitaire religieux local, est particulièrement bien décrite dans une étude sur l'épidémie de 2004 dans le district de Faridpur au Bangladesh (Gurley et al. 2007).

4. Contamination alimentaire

Au Bangladesh et en Inde, l'absence du facteur porcin a fait suspecter l'existence d'autres voies d'infection pour le virus Nipah. Les études épidémiologiques ont montré que « boire du sirop de palme » (Luby *et al*, 2006) et « grimper dans les arbres » (Luby *et al*, 2009) sont deux facteurs de risque clés de l'infection par le virus Nipah, multipliant environ par 8 le risque d'infection. Par ailleurs, toutes les épidémies ont eu lieu pendant la période de récolte du sirop de palme, de mi-octobre au début du mois d'avril (Nahar *et al*, 2010). Cette récolte est une activité agricole traditionnelle au Bangladesh. Les ouvriers qui saignent et collectent la sève de palmier (*Phoenix sylvestris*) sont appelés *gachhis*.

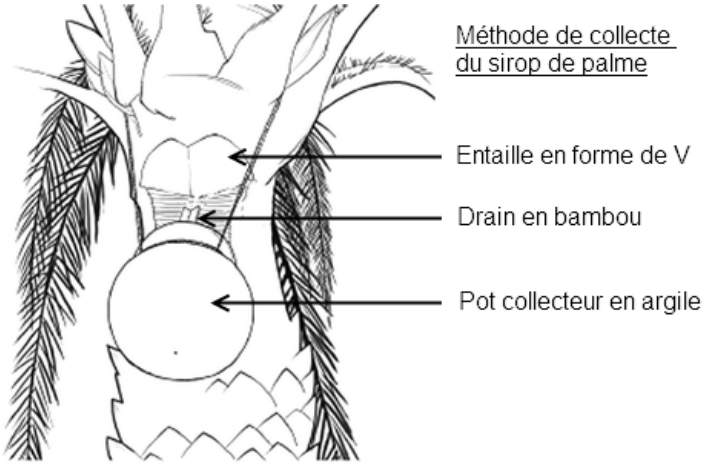


Figure 13 : Mode opératoire pour la collecte de sirop de palme. Adapté à partir de (Nahar et al*, 2010).*

Ils récoltent le sirop de palme en effectuant sur le tronc une entaille en forme de « V » de 20 cm par 30 cm, sur une profondeur d'environ 2 cm, à la base des branches. La forme de l'entaille permet l'écoulement de la sève le long d'un drain en bambou qui mène à un pot collecteur en argile suspendu sous l'entaille (cf. Figure 13).

Au Bangladesh, la sève de palmier est utilisée principalement sous deux formes : la plupart est transformée en mélasse et l'autre partie est consommée brute. Pendant l'hiver,

les *gachhis* collectent le sirop de palme très tôt le matin ; le sirop brut est revendu quelques heures plus tard sur les marchés locaux et consommé immédiatement avant de fermenter et de perdre son goût sucré (Nahar *et al*, 2010).

Une étude utilisant une caméra infrarouge (Salah Uddin Khan *et al*, 2011) a permis de démontrer que les chauves-souris frugivores sont friandes du sirop de palme. Elles sont susceptibles de contaminer la sève par leur salive, leurs fèces et leur urine (cf. Figure 14).

Figure 14 : Chauves-souris surprises en train de lécher (flèche noire) et d'uriner (flèche blanche) dans la sève collectée (Salah Uddin Khan et al*, 2011)*

Au Bangladesh, ce mode de contamination a été formellement démontré et serait responsable d'une large majorité de cas (Rahman *et al*, 2012). Depuis mars 2011, la commercialisation du sirop de palme sous forme brute est d'ailleurs formellement interdite par décret gouvernemental pendant les périodes à risque pour tenter d'enrayer la recrudescence de cas humains.

III. Tableau clinique

A. Symptômes

1. Chez la chauve-souris frugivore (*Pteropus sp*)

L'infection des chauves-souris par les Henipavirus est subclinique et généralement indétectable dans le contexte naturel. Dans le contexte expérimental, on ne note pas non plus de signes cliniques, pas d'élévation de température ni de perte de poids (Middleton *et al*, 2007).

2. Chez le porc

Les symptômes détectés chez le porc sont essentiellement de type respiratoire. Le terme de « syndrome du cochon aboyeur », en référence à la toux puissante associée à l'infection, a d'ailleurs été l'un des tout premiers termes techniques utilisés pour décrire la maladie. L'infection est néanmoins asymptomatique dans la plupart des cas. Les signes cliniques diffèrent un peu selon l'âge auquel l'animal est infecté (Mohd Nor *et al*, 2000) .

a. Porcelets avant sevrage (< 4 semaines)

La majorité des porcelets infectés présentent une respiration laborieuse, bouche ouverte, une faiblesse des membres et des tics neurologiques. L'infection par le virus Nipah à cet âge présente un taux de mortalité supérieur à 40 %. Il n'est cependant pas très clair s'il s'agit de mortalité directe liée au virus ou le résultat d'un défaut de soin et de nourrissage par les mères infectées.

b. Porcelets au sevrage (> 4 semaines) et à l'engraissement (< 6 mois)

Cette catégorie d'animaux présente généralement un syndrome fébrile aigu (> 39,9°C) avec des signes respiratoires allant d'une respiration rapide et laborieuse à une forte toux non productive sévère. Une hémoptysie peut être observée sur les cas sévères et une respiration bouche ouverte sur les cas un peu moins sévères. Parmi les signes neurologiques pouvant être observés, on recense des tremblements et tics neurologiques, des myoclonies, une faiblesse du train arrière, un degré variable de parésie spastique, de la boiterie, une démarche incoordonnée et enfin, une douleur généralisée particulièrement localisée sur les quartiers arrières. Dans cette catégorie, la maladie peut être asymptomatique, modérée ou fulminante et amplifiée par le stress. La morbidité est proche de 100 % et la létalité de 1 à 5 %.

c. Truies et verrats reproducteurs

Les reproducteurs présentent globalement les mêmes symptômes que les porcs à l'engraissement. Néanmoins, on note l'existence de particularités avec une sialorrhée intense, un écoulement nasal muqueux, muco-purulent ou sanguinolent et un possible effet abortif pendant les trois premiers mois de gestation. Les signes neurologiques sont un peu plus larges dans cette catégorie avec une agitation générale, un syndrome du « pousse au mur », des convulsions et spasmes de type tétanique, un nystagmus, des mâchonnements,

une paralysie apparente des muscles pharyngés expliquant les difficultés de déglutition, l'apparition de mousse dans la bouche et une langue pendante.

3. Chez le cheval

Le premier article à relater l'émergence du virus Hendra (à cette époque nommé « nouveau Morbillivirus de la pneumonie équine ») chez le cheval rapporte une anorexie sévère, de la dépression, de la fièvre (généralement supérieure à 41°C), une élévation de la fréquence respiratoire et de l'ataxie. Des comportements de « pousser au mur » sont parfois observés et s'expliquent par une augmentation de la pression du liquide céphalo-rachidien liée à l'inflammation. Ce comportement permet de réduire la pression à l'intérieur de la boîte crânienne et donc de soulager l'animal. De façon très fréquente, un écoulement nasal spumeux apparait peu avant la mort (Murray, Rogers, *et al*, 1995). Globalement, les symptômes sont particulièrement centrés sur la sphère respiratoire.

4. Chez l'homme

La toute première étude, portant sur 94 patients, recense de façon exhaustive les signes cliniques identifiés lors de l'épidémie malaisienne de 1998-1999 (Goh *et al*, 2000). Ces signes sont recensés dans le Tableau 2. Les signes neurologiques sont une caractéristique forte de la maladie et ceux-ci sont particulièrement augmentés lorsque le niveau de conscience est réduit.

Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah chez l'homme d'après (Goh et al*, 2000).*

Signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah		% de patients atteints (n=94)
Signes généraux	Fièvre	97
	Maux de tête	65
	Vertiges	36
	Vomissements	27
	Toux sèche	14
	Myalgie	12
Signes neurologiques	Diminution du niveau de conscience	55
	Signes neurologiques focaux	11
	Absence ou diminution des réflexes	56
	Pupille anormale	52

	Tachycardie (>120 bpm)	39
	Hypertension (>160/90 mmHg)	38
	Réflexe vestibulo-oculaire	38
	Myoclonie segmentaire	32
	Syndrome méningé	28
	Epilepsie	23
	Nystagmus	16
	Syndrome cérébelleux	9
	Ptose bilatérale	4
	Tremblement postural bilatéral	3
	Dysarthrie	3
	Dysphasie	2

Les fréquences ne sont néanmoins pas très fiables et ne donnent qu'une idée de la répartition des signes cliniques. Le plus intéressant en termes de recensement des signes cliniques concerne très certainement la comparaison entre les signes cliniques observés en Malaisie et au Bangladesh (Chong *et al*, 2008).

Le fait que la part respiratoire des signes cliniques soit un peu plus faible dans l'épidémie malaisienne de 1998-1999 (de 14 % (Goh *et al*, 2000) à 29 % (Chong *et al*, 2002)) constitue la principale différence clinique entre les épidémies de ces deux pays. Dans les épidémies du Bangladesh, on note l'apparition de toux (62 % des cas) et de difficultés respiratoires (69 % des cas) avec des radiographies pulmonaires montrant une opacité bilatérale qui couvre la majorité des poumons (cf. Figure 15).

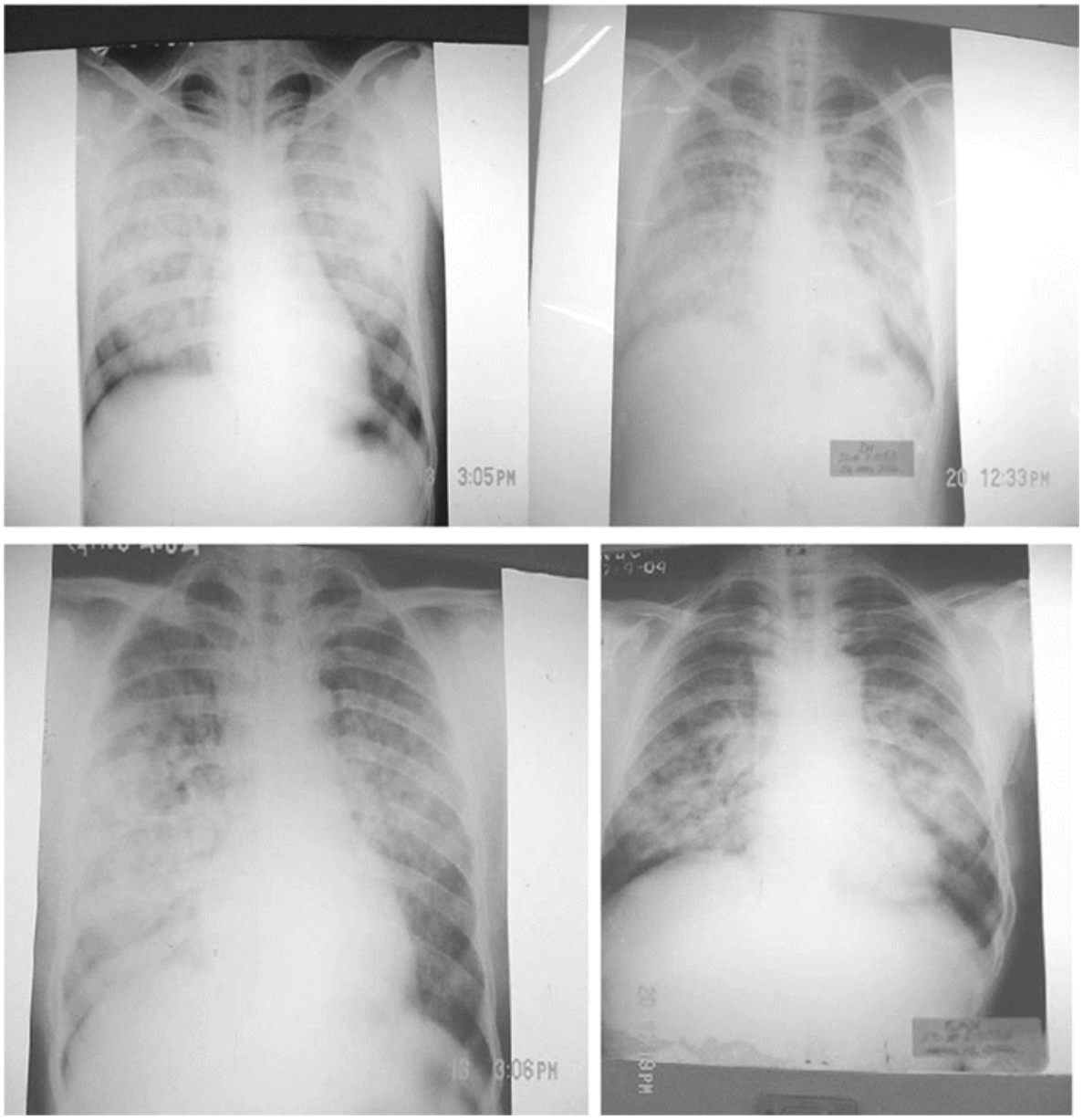


Figure 15 : Radiographies pulmonaires de 4 patients, montrant une opacité diffuse bilatérale couvrant la majorité des poumons, compatibles avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Issu de (Hossain et al*, 2008).*

Dans l'épidémie de Siliguri, en Inde, les symptômes respiratoires sont rapportés dans 51 % des cas (Chadha *et al*, 2006). La proéminence du caractère respiratoire de la maladie liée à l'infection par la souche bangladaise constitue un des facteurs favorisant l'apparition d'une transmission interhumaine. La seconde différence majeure entre les deux zones géographiques est la présence de myoclonies segmentaires persistantes observées dans 32 % (Goh *et al*, 2000) à 54 % (Chong *et al*, 2002) des cas malaisiens qui n'est pas retrouvée au Bangladesh ; bien que l'hyporéflexie générale des patients malaisiens soit aussi présente chez les patients bangladais (Hossain *et al*, 2008).

Les rechutes d'encéphalites apparaissant des mois voire des années après un premier épisode (associées une fièvre aiguë, des céphalées, convulsions et troubles neurologiques focaux) constituent une autre particularité de la maladie liée à l'infection par le virus Nipah. En Malaisie, une étude portant sur 24 mois de suivi annonce qu'environ 10% des patients ont été touchés par ces rechutes ou encéphalites tardives (Tan *et al*, 2002). Au Bangladesh, une étude portant sur 22 cas observe les mêmes rechutes, avec un taux de 18 % (4 cas) (Sejvar *et al*, 2007). Les signes cliniques associés à ces rechutes semblent particulièrement concerner les nerfs crâniens avec notamment une paralysie des muscles oculomoteurs, un nystagmus ou affaissement du visage.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences cliniques observables entre les épidémies ayant eu lieu en Malaisie et au Bangladesh. Tout d'abord, les différences génétiques entre les deux souches virales jouent très certainement un rôle dans l'expression et la virulence de la maladie. Ensuite, le Bangladesh et la Malaisie sont des pays avec un niveau de développement très différent. En effet, le Bangladesh compte parmi les pays les moins développés d'Asie, derrière le Pakistan, avec un Indice de Développement Humain (IDH) de 0,469 contre 0,744 pour la Malaisie (le maximum étant de 0,938 pour la Norvège). En d'autres termes, la Malaisie fait partie des 60 pays les plus développés du monde alors que le Bangladesh fait partie des 40 pays les moins développés du monde (Anon, s. d.). Ceci a pour conséquences directes des conditions de vie, d'hygiène et de nutrition bien moins favorables au Bangladesh ainsi qu'un accès aux soins bien plus limité qu'en Malaisie pouvant expliquer une mortalité plus élevée et une transmission interhumaine plus facile.

La mort survient entre 3 et 10 jours après le début des signes cliniques pour la souche bangladaise (6 jours en moyenne) (Hsu *et al*, 2004) et entre 3 et 31 jours pour la souche malaisienne (6,9 jours en moyenne) (Goh *et al*, 2000). Elle est due à l'encéphalite sévère et la défaillance de nombreux organes dont le cœur, les reins et les poumons.

5. Autres

Dans les modèles expérimentaux, on retrouve avec plus ou moins d'exhaustivité les signes cliniques observés chez l'homme. Selon le sujet de l'étude, on préfèrera donc l'utilisation d'un modèle animal chez qui le virus possède plutôt un tropisme respiratoire (porc ou furet), neurologique (hamster ou cochon d'inde) ou mixte (singe).

B. Lésions

1. Macroscopiques

Les lésions provoquées par les Henipavirus sont assez caractéristiques et ont permis de soupçonner l'émergence de ces nouveaux virus. En effet, chez les cas malaisiens de Nipah, pendant la phase d'encéphalite aiguë, les images du cerveau par résonance magnétique (IRM) montrent l'apparition de zones de haute intensité de 2 à 7 mm, distinctes, disséminées dans le cerveau et principalement en zones subcorticale et profonde de la matière blanche des hémisphères cérébraux. Ces changements signent de multiples lésions de micro-infarctus résultant de la vascularite généralisée des capillaires cérébraux (Sarji *et al*, 2000) (cf. Figure 16). Au Bangladesh, on observe plutôt des lésions confluentes qui touchent à la fois la matière blanche et la matière grise (Sejvar *et al*, 2007) (cf. Figure 17). Dans le cas d'une infection par le virus Hendra, les lésions cérébrales sont assez similaires et varient entre celles observées en Malaisie et au Bangladesh selon le niveau de gravité de l'infection (Nakka *et al*, 2012).

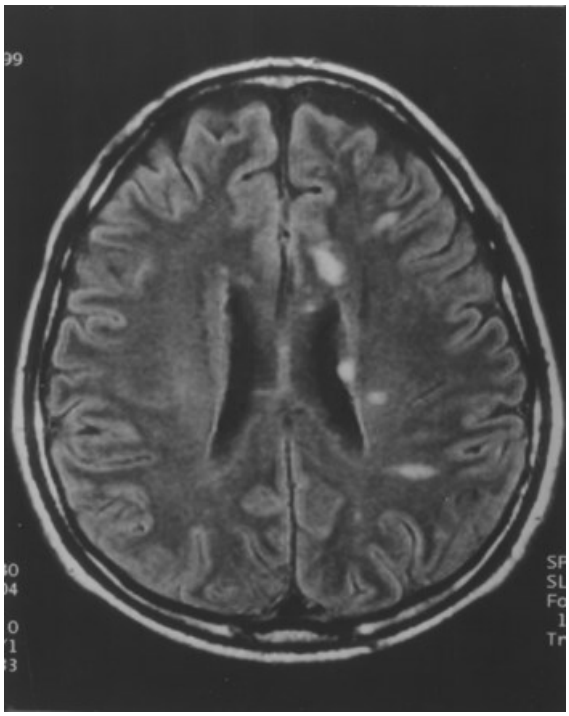


Figure 16 : Image par résonance magnétique du cerveau d'un homme malaisien de 44 ans atteint par le virus Nipah. L'image montre de multiples lésions subcorticales distinctes. Extrait de (Sarji et al*, 2000).*

A l'autopsie, les lésions ne sont pas vraiment spécifiques et sont la conséquence d'une vascularite généralisée. On observe de multiples pétéchies et hémorragies sur la

plèvre, les poumons, les reins et le cœur. On note aussi généralement de petites lésions nécrotiques assez caractéristiques, occasionnellement hémorragiques, disséminées sur le cerveau (Wong *et al*, 2002a). Chez le singe, on retrouve des lésions similaires : poumons consolidés présentant des zones congestives et hémorragiques, œdème et hémorragies sur la paroi vésicale et le cerveau (Geisbert *et al*, 2010).

Figure 17 : Image par résonance magnétique du cerveau d'une femme bangladaise de 36 ans atteinte par le virus Nipah. L'image montre des anomalies de signal diffuses, confluentes en zones corticale et subcorticales. Extrait de (Sejvar et al*, 2007).*

Chez le porc et le cheval, les lésions sont majoritairement pulmonaires avec des niveaux variables de consolidation, de l'emphysème et des hémorragies pétéchiales ou des suffusions. Le cerveau peut présenter une congestion généralisée associée à de l'œdème. Plus rarement, les reins sont aussi congestionnés (Mohd Nor *et al*, 2000; Murray, Rogers, *et al*, 1995).

2. Microscopiques

A l'histologie, les lésions observées sont principalement de types hémorragique et nécrotique, même si le caractère majeur signant la présence des Henipavirus dans les tissus est la formation de cellules géantes multinuclées appelées syncytia. Ces syncytia sont issus

de la fusion de plusieurs cellules et sont généralement identifiables par la présence de plusieurs noyaux, rassemblés au centre d'un cytoplasme abondant ou organisés en couronne (cf. Figure 18).

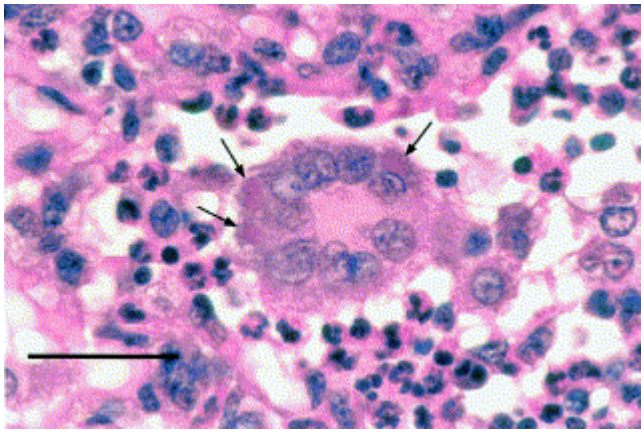


Figure 18 : Syncytium observé dans le tissu pulmonaire d'un porc infecté par le virus Nipah. Les flèches montrent des inclusions virales éosinophiliques. Barre = 50 µm. Tiré de (Hooper et al*, 2001).*

Les lésions sont observées dans de nombreux organes (cerveau, poumons, rate, reins, cœur, foie) et concernent fréquemment l'endothélium vasculaire. La vascularite associée à l'infection par le virus Nipah se caractérise par une destruction de l'endothélium, une nécrose murale souvent fibrinoïde, de la karyorrhexie et une infiltration inflammatoire de la paroi vasculaire par des polynucléaires neutrophiles et des cellules mononucléaires (Wong *et al*, 2002a) (cf. Figure 19).

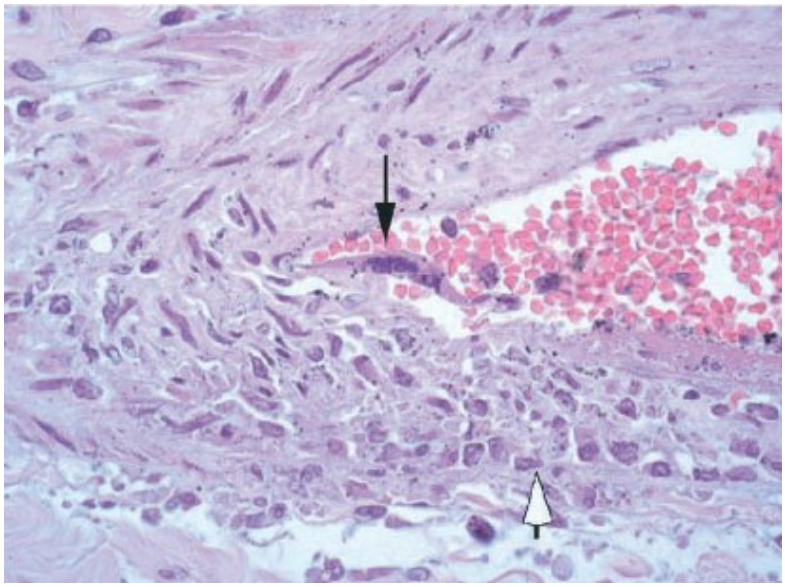


Figure 19 : Vascularite dans un vaisseau pulmonaire humain. La flèche noire montre un syncytium de cellules endothéliales et la flèche blanche montre une infiltration leucocytaire transmurale. Tiré de (Wong et al*, 2002a).*

Dans le système nerveux central, les principales lésions observables consistent en la présence de vascularite, thrombose, nécrose du parenchyme et inclusions virales. Les plaques nécrotiques corrèlent en termes de forme et de taille avec les lésions observées par IRM et sont retrouvées à la fois dans la substance noire et dans la substance blanche. Les infiltrats inflammatoires sont composés de polynucléaires neutrophiles, de macrophages, de lymphocytes et de cellules microgliales activées. Dans les cas de rechute, les lésions du parenchyme sont plus grandes et confluentes, parfois hémorragiques et associées à une perte neuronale sévère. On ne retrouve néanmoins pas de vascularite dans ces cas.

Dans le poumon, les lésions les plus fréquentes sont des vascularites et de la nécrose fribrinoïde alvéolaire. Ces lésions sont parfois associées à de l'œdème, des hémorragies et une inflammation sévère de l'épithélium bronchique. La rate présente une disparition de la pulpe blanche, de la nécrose et une inflammation aiguë des manchons périartériels. De nombreux syncytia sont généralement observables dans la rate. Dans les nœuds lymphatiques, on observe de grandes cellules réactives mononucléaires, de la nécrose et de l'hémophagocytose. Plus rarement, on peut voir des syncytia dans la zone bordant les sinus sous-capsulaire du nœud lymphatique. Dans les reins, la lésion la plus fréquente est une nécrose fibrinoïde des glomérules. Dans certains cas, la totalité des glomérules peuvent être détruits par l'inflammation. La vascularite, la thrombose et l'inflammation interstitielle généralement observées dans les autres organes sont moins fréquentes dans le rein, et les syncytia sont rares et en périphérie des glomérules. Dans le cœur, on observe assez peu de lésions, principalement de la vascularite rarement associée à des infarctus. Chez l'homme, aucune lésion particulière n'a été observée dans les autres organes.

IV. Diagnostic de certitude en laboratoire

Les informations de cette partie sont entièrement tirées des recommandations et procédures officielles formulées par l'Office International des Epizooties (OIE) dans son Manuel des tests diagnostiques et vaccins pour les animaux terrestres de 2008 (Anon, 2008).

A. Identification de l'agent pathogène

1. Isolement du virus et caractérisation

L'isolement des Henipavirus n'est pas chose aisée si l'on veut garantir au manipulateur des conditions de sécurité optimale. En effet, en raison du classement de ce

pathogène au niveau 4 de biosécurité, l'ensemble des prélèvements devrait se faire en scaphandre étanche autonome. Compte-tenu des risques liés au prélèvement, l'isolement viral n'est vraiment pertinent que lors de l'apparition d'un tout nouveau cas ou d'une nouvelle épidémie ; particulièrement dans les pays ou les régions géographiques où l'infection n'a pas été documentée auparavant. Pour faire un suivi du réservoir sauvage, on privilégiera soit une réponse sérologique, soit l'identification positive par PCR, soit l'isolement à partir d'animaux capturés.

L'isolement du virus est facilité par le fait que le virus Nipah se multiplie rapidement à haut titre en culture de cellules. Les cellules rénales de singe vert africain (Vero) et de lapin (RK-13) sont particulièrement sensibles. Un effet cytopathogène (ECP) se développe habituellement en 3 jours, mais un deuxième passage après 5 jours est recommandé avant de déclarer un échantillon négatif. En condition de faible multiplicité d'infection, l'ECP est caractérisé par la formation de syncytia qui peuvent, après 24 à 48 h, contenir 60 noyaux ou plus. Les syncytia formés par le virus Nipah sur les monocouches de cellules Vero sont significativement plus grands que ceux induits par le virus Hendra pendant le même délai. La distribution des noyaux dans les syncytia induits par le virus Nipah au début de l'infection ressemble à celle induite par le virus Hendra, avec les noyaux agglomérés au centre du syncytium. Ensuite, les noyaux dans les syncytia mûrs sont distribués en couronne au pourtour de la cellule géante.

L'identification définitive du virus pourra se faire par coloration immunologique des cellules fixées, sachant qu'il existe une réaction croisée entre les virus Hendra et Nipah en cas d'utilisation d'un antisérum polyclonal. On privilégiera l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécialement générés pour discriminer les deux virus. Le titre élevé généré par les virus Hendra et Nipah dans les cellules *in vitro* permet aussi leur visualisation dans le milieu de culture par microscopie électronique en contraste de phase négatif sans étape de concentration par centrifugation. La détection de complexes virus-anticorps par immuno-microscopie électronique fournit des informations précieuses sur la structure du virus et la réactivité antigénique, même durant le premier isolement du virus. D'autres techniques ultrastructurales sont possibles. La culture cellulaire sur grille peut être réalisée. Dans cette technique, les cellules sont cultivées, infectées et visualisées sur des grilles au microscope

électronique. Il est aussi possible d'identifier la réplication des virus et des corps d'inclusion dans des coupes ultrafines de cultures cellulaire fixées.

2. Test de séroneutralisation virale : différenciation entre virus Hendra et virus Nipah

Les tests de neutralisation reposent sur des méthodes de quantification. L'antisérum anti-Hendra neutralise le virus Hendra à une dilution généralement 4 fois plus grande que celle qui neutralise le virus Nipah. Réciproquement, pour le virus Nipah. Une nouvelle version du test de séroneutralisation différentielle a été décrite récemment qui évite la manipulation de virus infectieux par l'emploi de microbilles liées à l'éphrine-B2. Bien que ce test doive encore être validé formellement, il apparaît d'ores et déjà comme un outil de criblage utile dans les pays qui ne possèdent pas de structures de confinement de niveau 4.

3. Méthodes de reconnaissance basée sur les acides nucléiques

Les génomes des deux virus Hendra et Nipah ont été entièrement séquencés, et des méthodes basées sur des PCR ont été utilisées pour détecter les virus et ont été validées dans un certain nombre de laboratoires. La PCR en temps réel apparaît être une approche sensible et utile pour la détection du génome d'Henipavirus dans les échantillons. En termes de sécurité, cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter la multiplication de virus infectieux vivant. Les protocoles et les amorces dépendent du plateau technique et des produits chimiques disponibles dans les laboratoires.

4. Détection d'antigènes d'Henipavirus dans des tissus fixés pour immunohistochimie

L'immunohistochimie s'est révélée être une des épreuves les plus utiles dans la détection des virus Hendra et Nipah. Effectuée sur des tissus ou des cellules fixées au formol, cette méthode offre l'avantage d'être sûre du point de vue de la biosécurité. Elle permet par ailleurs des investigations rétrospectives sur du matériel archivé. Comme la réplication virale et la lésion primaire se produisent dans l'endothélium vasculaire, il existe une large gamme de tissus dans lesquels les antigènes des virus Hendra et Nipah peuvent être détectés. Idéalement une soumission pour l'immunohistochimie doit inclure des échantillons de différentes parties du cerveau, du poumon, des nœuds lymphatiques médiastinaux, de la rate et du rein. Chez les animaux gestants, l'utérus, le placenta et des tissus fœtaux doivent

être inclus. Plusieurs antisérums anti- Hendra et Nipah peuvent être utilisés dans les études immunohistochimiques des tissus infectés, mais les sérums de lapin anti-Hendra et Nipah purifiés par la méthode des plages se sont révélés être particulièrement efficaces. Quelques AcMs sont aussi disponibles. Un système de détection biotine-streptavidine lié à une peroxydase est aussi envisageable. Le système de détection préféré est un réactif lié à un polymère dextran anti-lapin/anti-souris conjugué à une phosphatase alcaline.

B. Epreuves sérologiques

Dans les laboratoires réalisant des épreuves sérologiques surtout lors d'épidémies, plusieurs stratégies ont été adoptées pour réduire le risque d'exposition du personnel de laboratoire aux virus Hendra et Nipah. Les sérums peuvent être irradiés aux rayons gamma (6 kiloGrays) ou dilués au 1/5 dans du PBS contenant 0,5 % de Tween 20 et 0,5 % de Triton-X100 et inactivés par la chaleur à 56 °C pendant 30 min. Le protocole choisi le sera sur la base d'une évaluation du risque. Les échantillons à des fins de surveillance et pour la certification dans le but de mouvement d'animaux sont considérés comme présentant un risque pour la biosécurité plus faible que ceux soumis pour recherche de la maladie. Dans certaines circonstances, l'inactivation par la chaleur peut être retenue comme précaution suffisante. Cependant, il est préférable d'avoir une approche harmonisée et normalisée pour la gestion de tous les échantillons plutôt que plusieurs méthodes différentes.

1. Test de séroneutralisation du virus

Les Henipavirus peuvent être quantifiés par des tests de plage de lyse, de microtitrage ou de plages colorées immunologiquement. Ces tests peuvent être modifiés pour détecter les anticorps spécifiques du virus (voir ci-dessus). Le test de neutralisation virale (SN) est accepté comme étant le test de référence.

2. Épreuves immuno-enzymatiques

En 1994, pour répondre à l'épidémie initiale à virus Hendra, un ELISA indirect a été développé. L'antigène était produit à partir de cellules infectées par le virus Hendra. En 1999, le programme national de surveillance des porcs en Malaisie recourait à un ELISA similaire. Par la suite et afin de contrôler les niveaux élevés d'activité de liaisons non spécifiques dans les sérums porcins, un ELISA modifié a été mis au point. Celui-ci était basé sur la réactivité relative des sérums avec l'antigène du virus Nipah par rapport à leur réactivité avec un antigène témoin obtenu par le traitement de cellules Véro non infectées.

Au *Center for Diseases Control* à Atlanta (USA), une double approche sérologique a été mise en œuvre. Un ELISA indirect était utilisé pour la détection des IgG. Un ELISA de capture permettait quant à lui la détection des IgM. Un ELISA utilisant un antigène recombinant de la nucléocapside a été décrit pour le virus Nipah, qui permet aussi de différencier entre les IgM et IgG. La spécificité de l'ELISA indirect pour le virus Nipah (98,4 %) signifie que, dans les programmes de surveillance, le test va générer des faux positifs. Ce n'est pas un problème significatif en face d'une épidémie de virus Nipah où une grande proportion des porcs est infectée et dont le but de la surveillance est de détecter les fermes infectées. Cependant, ce niveau de spécificité est un problème réel en dehors du contexte épidémique ou si le nombre d'échantillons à tester est limité. Si un résultat positif en ELISA était indicatif d'une véritable infection, l'absence de mesures adéquates et le délai de réponse peuvent conduire à une dispersion du virus et à des décès humains. Au contraire, les mesures de contrôle initiales excessives en réponse à un faux positif résultant de l'ELISA constitueraient une fausse alerte et des dépenses inutiles. L'approche courante consiste à tester tous les sérums positifs en ELISA par le test de SN, avec des sérums témoins positifs au test de SN. Un test de SN de confirmation doit être fait sous conditions de biosécurité P4 et ceci peut nécessiter un envoi des échantillons dans un laboratoire reconnu.

V. Prophylaxie et traitement

A. Prophylaxie socio-environnementale

La toute première prophylaxie ayant fait preuve d'efficacité est d'ordre socio-environnemental. En effet, en empêchant le contact avec le réservoir que sont les chauves-souris frugivores, on évite une contamination des populations. La déforestation liée à l'intensification de l'agriculture constitue un facteur d'émergence important mais reste difficile à contrôler. Néanmoins, la superposition des vergers avec les zones d'élevages porcins ou équins peut être évitée afin de limiter la contamination de ces hôtes intermédiaires. En application de ces mesures, l'élevage de porc est interdit dans 7 provinces malaisiennes sur 13.

Figure 20 : Natte de bambou couvrant le dispositif destiné à récolter le sirop de palme et empêchant l'accès des chauves-souris. Tiré de (Salah Uddin Khan et al*, 2011).*

Au Bangladesh, où le principal mode de contamination est lié à la consommation de sirop de palme, la commercialisation de ce jus a été provisoirement interdite (Mcneil, 2011). Une solution moins draconienne consiste à favoriser l'emploi de nattes de bambous pour protéger les sites de saignée sur les palmiers (Nahar *et al*, 2010) (cf. Figure 20). Cette technique, pourtant utilisée de façon ancestrale, avait peu à peu disparu par souci d'économie de travail. Sa réhabilitation constitue à l'heure actuelle la meilleure prophylaxie existante.

B. Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire est relativement efficace mais intervient souvent lorsque l'épidémie est déjà bien déclarée. Elle passe par une sensibilisation massive des populations aux règles de bonne pratique d'hygiène. Lors de l'épidémie malaisienne, les recommandations ont été diffusées par l'intermédiaire de la télévision, la radio, les écoles et la presse. Les autorités malaisiennes ont fait éditer des posters, livrets et dépliants explicatifs dans différentes langues qui ont été largement diffusés auprès des populations. Un site

internet et une ligne téléphonique dédiée ont même été mis en place (Chua, 2010). En outre, l'euthanasie préventive des animaux issus des foyers infectieux est une solution drastique mais relativement efficace.

Les Henipavirus étant des virus enveloppés, ils sont très sensibles à l'action des détergents. L'utilisation intensive de savons et détergents est une mesure à faible coût qui permet une diminution de la pression d'infection. Elle doit être appliquée à la fois sur les personnes (hygiène des mains notamment) et sur les outils au contact avec des matières infectieuses (couteaux, outils d'abattoir mais aussi matériel médical). Le port de vêtements de protection jetables à manches longues, de gants, de masques, de lunettes de protection et de bottes est fortement recommandé à toute personne pouvant se retrouver accidentellement avec du matériel infectieux (aérosols, urine, sécrétions, …).

C. Prophylaxie médicale

Il n'existe à ce jour aucune prophylaxie médicale connue pour l'homme. Les tentatives de création de vaccins ne permettent pas d'envisager une application humaine à court terme (Guillaume *et al*, 2004; Walpita *et al*, 2011) même si un vaccin recombinant utilisant un vecteur Canarypox s'avère très prometteur chez le porc (Weingartl *et al*, 2006). Des peptides capables d'inhiber de façon compétitive la fusion de l'enveloppe du virus avec celle de la cellule ont vu le jour récemment et leur étude est encore en cours (Porotto *et al*, 2010). Une autre approche plutôt originale a été tentée avec la fabrication de « protocellules » qui servent de leurres. Le virus entre à l'intérieur de ces cellules artificielles grâce à l'expression des protéines d'attachement Ephrine B2 se trouvant en surface. Une fois à l'intérieur de cette fausse cellule, le virus se retrouve piégé et ne peut plus en sortir (Porotto *et al*, 2011). Dans le cas de Hendra, un vaccin commercial pour le cheval a déjà vu le jour. Il s'agit d'un vaccin sous-unité de la protéine G recombinante de Hendra (Pallister *et al*, 2011) commercialisé par Zoetis.

D. Traitement

Il n'existe à ce jour encore aucun traitement qui soit approuvé pour le traitement d'une infection aux Henipavirus. Néanmoins, des pistes prometteuses sont envisagées avec l'utilisation d'un anticorps monoclonal humain dirigé contre la protéine G du virus (Zhu *et al*, 2006; Zhu *et al*, 2008). Cet anticorps a été testé avec succès chez le furet avec le virus Nipah (Bossart *et al*, 2009) et chez le singe avec le virus Hendra (Bossart *et al*, 2011). Les fortes

doses utilisées dans ces études et l'absence de suivi sur le long terme ne permettent cependant pas d'envisager une utilisation immédiate chez l'homme.

VI. Contexte d'étude

A. Classification du virus au niveau 4 de biosécurité

L'étude des Henipavirus n'est pas chose aisée. En effet, le taux de létalité particulièrement élevé et l'absence de traitements prophylactique et thérapeutique ont conduit les autorités internationales à classer les Henipavirus comme agents pathogènes de niveau 4 sur l'échelle de dangerosité microbiologique de l'OMS (cf. Tableau 3). Cette classification s'accompagne de mesures de confinement extrêmement strictes auxquelles, en France, seul le laboratoire P4 « Jean Mérieux » de Lyon est capable de répondre. Ce laboratoire est encore aujourd'hui la structure de ce niveau de confinement offrant la plus grande capacité d'expérimentation en Europe.

Tableau 3 : Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque

Groupe de risque 1 (*risque faible ou nul pour les individus ou la collectivité*)	• Micro-organisme qui, selon toute probabilité, ne peut causer de maladie humaine ou animale.
Groupe de risque 2 (*risque modéré pour les individus, faible pour la collectivité*)	• Germe pathogène capable de provoquer une maladie humaine ou animale mais qui ne présente vraisemblablement pas un sérieux danger pour le personnel de laboratoire , la collectivité, le bétail ou l'environnement. Une exposition en laboratoire est susceptible d'entraîner une infection grave, mais qui peut être traitée ou prévenue efficacement; par ailleurs le risque de propagation de l'infection est limité.
Groupe de risque 3 (*risque important pour les individus, faible pour la collectivité*)	• Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale, mais qui ne se transmet généralement pas d'un individu à l'autre. Il existe un traitement et des mesures préventives efficaces.
Groupe de risque 4 (*risque important pour les individus comme pour la collectivité*)	• Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale et peut se transmettre facilement d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement. Il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces.

(OMS)(Organisation mondiale de la santé, 2005)

B. Le travail en conditions P4

Pour protéger efficacement les scientifiques qui travaillent sur les pathogènes de niveau 4 ainsi que les populations environnantes au laboratoire, le système de biosécurité du laboratoire est principalement basé sur l'existence de plusieurs niveaux d'enceintes hermétiques, dont la liaison est assurée par des sas de décontamination, et sur l'utilisation d'un système de contrôle des pressions. Les chercheurs ne travaillent jamais seuls et sont équipés d'un scaphandre étanche maintenu en surpression pour les protéger de toute contamination en cas de rupture éventuelle. Le laboratoire est lui-même maintenu en dépression afin de protéger l'environnement de toute fuite accidentelle. De plus, tous les déchets produits sont totalement inactivés chimiquement et stérilisés à la vapeur. L'air extrait est purifié par un système de double filtration absolue.

C. Comparaison des deux souches de virus Nipah existantes

Compte tenu de sa classification au niveau 4 de biosécurité, une des difficultés majeures liée à la recherche sur le virus Nipah concerne la disponibilité des souches virales. L'intégralité des travaux présentés dans cette thèse se fonde sur l'utilisation de la souche Nipah isolée en 1998 lors de la première épidémie en Malaisie.

Tableau 4 : Homologie prédictive des différentes protéines virales entre les souches malaisiennes et bangladaises du virus Nipah (Harcourt et al*, 2005).*

Protéine virale	% d'homologie prédictive
N	98,3 %
P	92 %
V	92,5 %
W	100 %
C	95,2 %
M	98,9 %
F	98,4 %
G	95,5 %
L	98,2 %

Malheureusement, le laboratoire n'a pas eu accès que très récemment aux souches plus récentes des épidémies bangladaises qui présentent une homologie du génome viral de 91,8% avec la souche malaisienne (Harcourt *et al*, 2005). L'homologie prédictive des

différentes protéines virales est supérieure à 92% (cf. Tableau 4). Dans ce contexte, on peut imaginer que la souche actuelle qui sévit au Bangladesh réagit un peu différemment de celle qui est apparue initialement en Malaisie. Ceci constitue par ailleurs une des limites de notre étude.

D. Les enjeux économiques liés aux épidémies de virus Nipah

Lors de la première épidémie en Malaisie en 1998-1999, les mesures sanitaires prises par les autorités malaisiennes ont conduit à l'abattage de 1,1 millions de porcs (Mohd Nor *et al*, 2000). En dehors de la perte sèche pour l'industrie porcine estimée à 65,6 millions d'euros, c'est toute l'économie malaisienne qui a été malmenée. Ainsi, l'industrie de l'alimentation du bétail, le secteur agro-alimentaire (et particulièrement la portion huiles et graisses), le commerce de gros et de détail ou encore le secteur des transports ont tous subi des dommages qui portent l'estimation globale de cette crise à un coût de 126,8 millions d'euros (Hosono *et al*, 2006). Néanmoins ces chiffres sous-estiment encore largement le coût réel qui comprend les frais d'abattage et d'assainissement, les compensations pour les éleveurs … Une étude publiée en 2003 (Lam, 2003) a estimé que cette crise a affecté le travail de 8500 personnes travaillant dans le secteur porcin, 9400 personnes supplémentaires travaillant dans les industries associées et 300000 personnes d'autres secteurs concernés par la crise soit un total de près de 318000 personnes mises au chômage ou dont les fermes et entreprises ont fait faillite.

Au Bangladesh, les autorités ont interdit la vente de sirop de palme frais sur toute la surface du territoire depuis mars 2011(Mcneil, 2011). La perte économique liée à cette interdiction pourrait s'élever à plus de 20 millions d'euros et avoir des conséquences dramatiques sur l'économie agricole déjà fragile de ce pays en voie de développement.

E. Utilisation des Henipavirus comme agents de bioterrorisme

A cause de leur fort potentiel destructeur, leurs signes cliniques neurologiques flagrants, leur taux de létalité parmi les plus élevés du monde et la facilité déconcertante avec laquelle on peut les cultiver à haute concentration (Lee, 2007), les Henipavirus ont très vite été envisagés comme une arme potentielle de bioterrorisme (Lam, 2003). Bien qu'une transmission interhumaine ait été clairement identifiée avec la souche bangladaise du virus Nipah (Homaira *et al*, 2010), l'agro-bioterrorisme reste l'hypothèse la plus plausible et la plus destructrice car la morbidité chez le porc est proche de 100% (Mohd Nor *et al*, 2000). Ce

virus serait donc capable de réduire à néant toute la filière porcine et les industries plus ou moins directement dépendantes de l'industrie porcine en l'espace de quelques semaines. Les infections humaines secondaires seraient dans ce cas inévitables. Le virus Nipah a été classé par le *Center for Disease Control* (CDC) d'Atlanta (Etats-Unis) comme agent pathogène potentiel de bioterrorisme (Center for Disease Control, s. d.) au niveau 3 de priorité. Cette classification a permis d'augmenter considérablement les crédits alloués à la recherche sur ce pathogène et autoriser son étude dans les laboratoires P4 militaires, aux Etats-Unis notamment. En France, la Direction Générale de l'Armement finance une partie des projets de recherche ayant lieu dans le laboratoire P4 « Jean Mérieux » de Lyon, dont cette thèse.

Partie II. Objectifs

La compréhension des mécanismes de pathogenèse des Henipavirus est un des éléments indispensables pour assurer une meilleure prise en charge médicale, épidémiologique, économique et sociale dans les zones d'endémies et d'enzooties virales. Par ailleurs, cette compréhension profite aussi à l'ensemble de la communauté internationale car le risque représenté par l'utilisation des Henipavirus en tant qu'agents de bioterrorisme, ou par une mutation virale à l'origine d'une souche pandémique n'est pas exclu. Cette compréhension passe par l'étude du comportement viral face à différentes situations, particulièrement lors de son entrée et sa phase de dissémination.

Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que le virus était capable de se disséminer au sein de l'organisme par un mécanisme de trans-infection (Mathieu *et al*, 2011). Ce mode de diffusion rapide du virus dans l'ensemble de l'organisme est encore à ce jour mal compris et l'on ne sait toujours pas quelles sont les modalités de sa mise en œuvre. L'implication de ce mécanisme dans la pathogénèse virale est néanmoins particulièrement important. **Nous essayons donc d'identifier le rôle des héparanes sulfates dans ce phénomène et tâchons de caractériser des composés nous permettant de tirer parti de ces mécanismes, dans une optique prophylactique et/ou thérapeutique.** Néanmoins, seule une prise en charge efficace de l'infection par le système immunitaire permet à un individu infecté de se débarrasser du virus. Ces mécanismes restent toujours mal compris dans le cadre d'une infection par les Henipavirus, et les modèles animaux existants jusqu'à présent ne permettent pas de résoudre ce problème.

En effet, les Henipavirus sont capables d'infecter une vaste proportion de mammifères (K. P. Dhondt et Horvat, 2013). Parmi ceux-ci, la souris fait office d'exception car, bien qu'elle soit infectable par le virus (Dups *et al*, 2014), elle ne présente qu'une infection subclinique rapidement résolue (sauf dans le cas d'une immunodépression liée à l'âge par exemple (Dups *et al*, 2012)). Pour mieux comprendre l'immunopathogénèse virale, nous souhaitons donc mettre à profit ces données en utilisant des souris déficientes pour certaines voies de l'immunité afin **d'identifier les éléments immunitaires critiques** pour leur survie. Ces résultats nous apportent donc des réponses sur les composants du système immunitaire les plus efficaces, à l'origine d'une éradication totale du virus chez l'hôte.

L'identification de ces facteurs pourra nous permettre de **recentrer les stratégies de développement de vaccins ou d'antiviraux** en se focalisant sur ces points majeurs de la réponse immunitaire. Cette stratégie nous apporte des éléments de réponses intéressants à l'échelle de l'individu mais ne nous permettent cependant pas de comprendre la finesse des mécanismes d'interactions moléculaires hôte/pathogène mis en jeu lors de l'infection.

Les Henipavirus sont connus pour leur capacité à perturber les voies de signalisation de l'immunité innée par l'intermédiaire de leurs protéines non structurales que sont les protéines V, W et C (Yoneda *et al*, 2010). Dans une moindre mesure, la protéine P, qui partage une partie de sa portion N-terminale avec V et W, peut aussi intervenir dans cette perturbation. Cette perturbation met en cause la réponse immunitaire innée de l'hôte et impacte donc fortement la pathogénèse virale. Ces perturbations ont déjà largement été démontrées sur les voies de production et de signalisation de l'interféron de type I (IFN-I) mais, à ce jour, les voies de signalisation de NF-κB, un facteur de transcription impliqué dans un très grand nombre de processus inflammatoires, n'ont encore pas été explorées pour le moment. Des résultats de transcriptomique, obtenus précédemment par notre équipe (Mathieu, Guillaume, Volchkova, *et al*, 2012a), suggèrent l'importance de NF-κB et de sa perturbation par les protéines non structurales virales. Nous proposons donc de **mettre au point une approche pour étudier les effets des protéines non structurales du virus Nipah sur les voies de signalisation de NF-κB et ses conséquences possibles sur la pathogénèse du virus.**

Partie III. Rôle des Héparanes Sulfates dans l'infection par les Henipavirus

I. Les Héparanes sulfates

Les Héparanes sulfates (HS) sont des Glyco-Amino-Glycanes (GAG) ubiquitaires exposés à la surface des cellules eucaryotes. Ils sont composés d'une répétition de motifs disaccharidiques d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine auxquels peuvent se greffer des groupes sulfates. Ces molécules, fortement ramifiées, flexibles et chargées négativement, ont la capacité de fixer un grand nombre de protéines à la surface des cellules (Bishop *et al*, 2007). Cette propriété est à l'origine de l'implication des HS dans de nombreux processus biologiques, autant physiologiques que pathologiques. Ainsi, la liaison de l'antithrombine III aux HS induit un changement de conformation de cette protéine, à l'origine de son activation, qui lui permettra de lier et d'inhiber le facteur de coagulation Xa (Petitou *et al*, 2003). Etant donné leur très large distribution dans l'organisme et leur capacité à lier un grand nombre de protéines, les HS sont utilisées par un grand nombre d'agents pathogènes comme site de fixation à la surface des cellules. Ainsi, on retrouve des parasites tels que *Plasmodium falciparum* ou *Toxoplasma gondii*, des bactéries telles que *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus* ou *Helicobacter pylori* et des virus tels que le Virus de l'Immunodéficience Humaine –I (HIV-I), les virus de l'Herpès, le virus de la Dengue, le virus de la fièvre aphteuse ou encore des adénovirus (Vives *et al*, 2006). Dans le cadre d'une infection virale, les HS peuvent agir directement en tant que récepteurs viraux d'attachement et d'entrée, comme dans le cas du virus Herpès Simplex – I (HSV-I) (Shieh et Spear, 1994), ou en tant que corécepteurs, facilitant l'accès au récepteur spécifique et augmentant la concentration de particules virales à la surface de la cellule, comme dans le cas de HIV-I. Enfin les HS peuvent aussi jouer un rôle de protection des virions. En effet, il a été montré avec HIV-I que les virions pouvaient se retrouver « stockés » à la surface des cellules endothéliales non permissives pendant plusieurs jours sans perte d'infectiosité puis transmis par un mécanisme de trans-infection aux lymphocytes T circulants (Vives *et al*, 2005).

Dans cette partie, nous proposons d'identifier le rôle des HS dans l'infection aux Henipavirus et de proposer un inhibiteur d'infection basé sur ces découvertes.

II. Amélioration de l'infection sous la dépendance des Héparanes sulfates

Récemment, notre équipe a pu démontrer que le virus Nipah est en mesure d'utiliser un récepteur d'attachement à la surface des leucocytes différent de son récepteur d'entrée. Cette propriété permettrait au virus d'être protégé à la surface des leucocytes et de se disséminer dans tout l'organisme via le flux sanguin. Il s'agit donc d'un mécanisme d'infection en *trans* (Mathieu *et al*, 2011). Dans ce travail nous avons montré que les HS sont des récepteurs d'attachement à la fois pour le virus Nipah et le virus Hendra. En effet, dans un premier temps, nous avons montré que les cellules ne possédant pas d'HS sont incapables d'opérer une *trans*-infection et que leur infection est fortement réduite. Par des techniques de résonance plasmonique de surfaces, nous avons montré que des pseudo-particules virales pseudotypées avec la glycoprotéine G du virus Nipah sont capables de se fixer spécifiquement aux HS et à l'héparine mais pas aux autres GAGs. De plus, l'héparine (un analogue des HS) est capable de bloquer l'interaction entre le virus et les HS et, ce faisant, d'inhiber les mécanismes de *trans*-infection. L'héparine est aussi capable de se lier à EFNB3, un des récepteurs d'entrée du virus, et de réduire l'infection de cellules permissives *in vitro*. Enfin, l'utilisation d'héparine dépourvue de sa capacité anticoagulante chez le hamster a permis d'en améliorer la survie, permettant d'envisager l'utilisation de composés optimisés dans le cadre d'un traitement prophylactique ou thérapeutique.

Heparan Sulfate-dependent enhancement of Henipavirus infection

Cyrille Mathieu[1-5], Kévin P. Dhondt[1-5], Marie Châlons[1-5], Stéphane Mély[6], Hervé Raoul[6], François-Loïc Cosset[1-5], Denis Gerlier[1-5], Romain R. Vivès[7-9] and Branka Horvat[1-5]*

[1] CIRI, International Center for Infectiology Research

[2] Inserm, U1111, Lyon, France

[3] CNRS, UMR5308, Lyon, France

[4] Université Lyon 1, Lyon, France

[5] Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

[6] Laboratory P4-Jean Mérieux, INSERM, 69365 Lyon, France

[7] Univ. Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), Campus EPN, 71 avenue des Martyrs F-38000 Grenoble, France

[8] CNRS, IBS, F-38000 Grenoble, France

[9] CEA, DSV, IBS, F-38000 Grenoble, France

*To whom correspondence should be addressed: Branka Horvat, CIRI, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France. Phone: 33.437.282.392; Fax: 33.437.282.391; Email: branka.horvat@inserm.fr

Abstract

Nipah and Hendra virus are emerging zoonotic and highly pathogenic paramyxoviruses, belonging to the genus Henipavirus. They infect humans as well as numerous mammalian species. Both viruses use ephrin-B2 and B3 as cell entry receptors and following the initial entrance into an organism, they are capable of rapid transmission through the host. We have previously reported that Nipah virus can use another attachment receptor different from its entry receptors, to bind to non-permissive circulating leukocytes, thereby promoting viral dissemination within the host. Here, this receptor was identified as heparan sulfate for both Nipah and Hendra virus. Cells devoid of heparan sulfate were not able to mediate Henipavirus transinfection and showed reduced permissivity to infection. Virus pseudotyped with Nipah virus glycoproteins bound heparan sulfate and heparin but no other glycosaminoglycans in surface plasmon resonance assay. Furthermore, heparin was able to inhibit the interaction of the viruses with the heparan sulfate and to block cell-mediated transinfection of Henipavirus. Moreover, heparin bound to ephrin-B3 and restrained infection of permissive cells *in vitro*. Consequently, treatment with heparin, devoid of anticoagulant activity, improved the survival of Nipah-infected hamsters. Altogether, these results reveal heparan sulfate as new attachment receptor for Henipavirus and suggest it as a potential therapeutic target for the development of novel approaches against these highly lethal infections.

Author Summary

Henipavirus genus includes two closely related, highly pathogenic paramyxoviruses, Nipah and Hendra, which cause morbidity and mortality in animals and humans. Pathogenesis of Nipah and Hendra infections is poorly understood and efficient antiviral treatment is still missing. We have previously found that Nipah virus can use an attachment receptor, different from its entry receptors, to bind to non-permissive circulating leukocytes, thereby promoting viral dissemination within the host. Here, we identify this attachment molecule as heparan sulfate for both Nipah and Hendra virus. Accordingly, heparin was able to inhibit the interaction of the viruses with the heparan sulfate and to block cell-mediated transinfection of Henipavirus. Moreover, heparin bound also to viral entry receptor and thereby restrained infection of permissive cells *in vitro*. Consequently, heparin treatment improved survival of Nipah-infected hamsters. These results reveal heparan sulfate as new attachment receptor for Henipavirus and open novel perspectives for development of heparin sulfate – targeting therapeutic approaches against these emerging infections.

Introduction

Nipah virus (NiV) and the closely related Hendra virus (HeV) are emerging zoonotic pathogens classified in a new *Henipavirus* genus, belonging to the *Paramyxoviridae* family. Both viruses cause considerable morbidity and mortality in numerous mammalian species, including humans. HeV first appeared in 1994 in Australia [1], while NiV emerged in South East Asia in 1998 [2], causing regular outbreaks with very high mortality rate, varying between 50 and 100% [3]. The natural hosts for both viruses are fruit bats (*Pteropidae* family), with wide distribution in Australia, South-East Asia, India and Africa. Potential new virus spillovers thus present a constant risk for future outbreaks [3]. The endotheliotropism of these Henipavirus is responsible of systemic infections with generalized vasculitis, and may be associated to severe acute respiratory syndrome and encephalitis [3]. Both viruses are classified as biosafety level 4 pathogens and present important biosecurity threats [4]. There is currently neither vaccine nor treatment approved against human Henipavirus infection.

Henipaviruses feature two membrane glycoproteins: the attachment protein (G), which binds Ephrin (EFN) B2 and/or EFN-B3 entry receptors, common for both NiV and HeV [5,6,7] and the fusion protein (F) responsible of virus entry into the cell cytoplasm by fusion of viral and cellular membranes. NiV has been found to use another unknown attachment receptor to bind to non-permissive circulating leukocytes, thereby promoting viral dissemination within the host and transinfection of permissive target cells [8]. This receptor was sensitive to proteolytic degradation and virus internalization was not required for cell-mediated transinfection. As proteoglycans are used by several viruses for binding to target cells [9,10], we investigated their potential role as Henipavirus attachment receptor.

Heparan sulfate (HS) is a complex and sulfated polysaccharide of the glycosaminoglycan (GAG) family, linked to ubiquitous core proteins of cell surface and extracellular matrix of all eukaryotes. HS is composed of a repetition of a D-glucuronic acid/N-acetyl-D-glucosamine disaccharide motif that can be further modified by addition of sulfate groups. HS has the ability to bind to a vast repertoire of proteins and is involved in many physiological as well as pathological processes [11]. In addition, HS long carbohydrate chains provide easily accessible binding sites for a wide range of pathogens, including viruses, bacteria and parasites [11,12]. Commercial heparin, widely used for its anticoagulant

properties, is a GAG that is chemically related to HS [13,14], and displays protein-binding properties similar to HS.

In this study, we show that both NiV and HeV can use HS as an attachment receptor to mediate transinfection. In addition, HS facilitates Henipavirus infection *in cis* and heparin can compete with the HS for the binding to the virus, thereby limiting both transinfection and infection itself. Finally, heparin significantly reduced NiV infection in hamsters, suggesting its potential use to treat Henipavirus infections.

Results

Henipavirus uses HS for transinfection

We first asked whether leukocytes could capture HeV and transmit it to susceptible cells *in trans* without being infected themselves (Fig. 1A). As we had previously found for NiV [8], peripheral blood lymphocytes (PBLs) also transmitted cell-attached HeV to susceptible cells, indicating that transinfection is a mechanism shared by both members of the *Henipavirus* genus.

The transinfection by leukocytes can also be mimicked by CHO cells [8] which are resistant to Henipavirus infection due to the lack of entry receptors EFNB2 and B3 [7]. The treatment of CHO-K1 cells with Heparinase 3 inhibited by >90% their transinfection properties. Accordingly, CHO-derived cell lines that lack expression of HS because of their deficiency in GAG biosynthesis enzymes [15] were also highly disabled to mediate transinfection of NiV (Fig. 1B). To further characterize the NiV-GAG interaction we compared the ability of virus particles pseudotyped with NiV G and F glycoproteins or vesicular stomatitis virus G (VSV-G) protein [8] to bind surfaces functionalized with HS analog heparin (HP), using surface plasmon resonance (SPR). We detected much more efficient binding of NiV pseudotyped virus particles, compared to control VSV-G pseudotyped virus (Fig. 1C), underlying the importance of NiV glycoproteins in the analyzed interaction. To assess specificity of NiV/GAG interaction towards HS, we compared by SPR the binding of NiV-pseudotyped virus to surfaces functionalized with HS, heparin (HP) or dermatan sulfate (DS), another sulfated GAG (Fig. 1D). Although NiV-pseudotyped virus efficiently bound to HP and HS, we did not detect any interaction with the DS surface, suggesting an implication of

specific carbohydrate features. Altogether, these results suggested that NiV specifically uses HS as an attachment receptor to promote efficient transinfection.

Heparin is a competitive inhibitor of Henipavirus transinfection

As NiV-pseudotyped virus binds heparin in addition to HS (Fig. 1D), we next analyze the effect of heparin on the ability of PBLs and CHO-K1 to mediate NiV transinfection. Heparin reduced the transinfection property of PBLs and CHO-K1 cells by 80% and 90%, respectively (Fig. 2A). Strikingly, heparin was also active when applied after contact with the virus and both pre-treatment and post-treatment were effective to inhibit human PBL-mediated transinfection of either NiV or HeV (Fig. 2B). Furthermore, heparin also prevented the binding of NiV to CHO-K1 cells by 99% as measured by cell-associated viral RNA in pre-treatment regime, while the residual binding to the HS-defective pgsA-745 CHO cell line remained unaffected (Fig. 2C). These results indicated the ability of heparin to elute viral particles from cell-surface HS by competition.

Accordingly, soluble heparin was able to compete and inhibit pseudotyped NiV binding to immobilized HP or HS by SPR (Fig. 2D and data not shown) with 50% and ~100% reduction for 1 µg/ml and 10 µg/ml heparin respectively. Notably, other GAGs found on cell surface proteoglycans such as chondroitin sulfate (CS) A and C and dermatan sulfates (DS) were devoid of inhibition properties (Fig. 2E), revealing the specificity of the inhibition of NiV binding to HS by heparin. Finally, to determine which of two NiV membrane glycoproteins F or G are responsible for binding to heparin, the ability of HeLa cells stably expressing either NiV-F or -G to bind HP were analyzed by SPR (Fig. 2F). Despite the important background, probably due to presence of GAG-binding molecules at the surface of these cells, HeLa expressing NiV-G protein showed higher level of HP binding, compared to HeLa-NiV-F, which was indistinguishable from that of the parental HeLa cells. We conclude from these results that NiV transinfection requires binding to cell surface HS via NiV-G, a process that can be inhibited by competition using heparin.

HS facilitates Henipavirus infection in cis

As GAGs may play multiple roles in viral infection [11,16], we next investigated whether the HS could be directly involved in the Henipavirus infection *in cis,* in addition to its role in transinfection. The permissive Vero cells were treated with heparinase 3, to remove

the cell surface HS, prior to the infection with NiV. This resulted in a modest but significant reduction of the number of infected cells at 3 days post infection (Fig. 3A). Furthermore, the inhibition of HS sulfation in Vero cells by treating them with sodium chlorate significantly reduced their infection with both NiV (Fig. 3B) and HeV (Fig. 3C), the latter being much more sensitive to the sodium chlorate pretreatment than the former. Obtained results therefore suggest that HS sulfation status is determinant for the virus attachment to cells and infectivity.

Heparin inhibits infection in vitro

We then tested whether soluble GAGs could interfere with Henipavirus infection in *cis*. Heparin pretreatment of Vero cells reproducibly reduced the number of cells infected by either NiV or HeV (Fig. 4A). Furthermore, pretreatment of either cells or the virus was efficient, even with very low concentrations (5 µg/ml) (Fig. 4B). To distinguish the contribution of a heparin-mediated inhibition of NiV G binding to cell surface HS from binding to EFN-B2/3 entry receptor, HS-negative CHO-pgsA-745 cells stably expressing either EFN-B2 or B3 [7], were pretreated with 0.5 µg/ml of heparin and infected with NiV (Fig. 4C). Heparin treatment modestly, but significantly reduced the percentage of infected cells from both cell lines, indicating that this molecule may also directly inhibit or delay the binding of NiV to its entry receptors EFN-B2 and B3. This effect may be the consequence of direct heparin binding to EFN-B2 and/or B3, as recently suggested [17]. Indeed, SPR analysis suggested that both CHO-pgsA-745-EFN-B2 and B3 cells bound to heparin, in contrast to non-transfected cells (Fig. 4D) and proportionally to the level of expressed EFN-B2 and B3 transcripts (Fig. 4E). Accordingly, soluble recombinant EFN-B3 bound to heparin in SPR as well (Fig. 4F), fitting a 1:1 Langmuir binding model and yielding a *Kd* of 16$\pm$6 nM for the interaction. Additional SPR analysis showed interaction of EFN-B3 with both HS and heparin, but not with chondroitin sulfate (data not shown). Thus, by its abilities to compete with HS to bind to NiV G and to interfere with EFN-B2/B3 receptors, heparin can restrict with both *trans*- and *cis*- infection by Henipavirus.

Heparin treatment restricts Nipah virus infection in animals

Well known for its anticoagulant properties, heparin binds and activates anti-thrombin III (AT-III) through a specific pentasaccharide sequence [18,19]. To test the antiviral

effect of heparin during NiV infection *in vivo* and avoid potential hemorrhagic complications, we produced heparin lacking anticoagulant activity using periodate oxidation (PO-heparin) that alters integrity of the AT-III-binding pentasaccharide motif [13]. Since the PO-heparin inhibited lymphocyte-mediated NiV transinfection *in vitro* similarly to heparin (Fig. 5A), we tested the antiviral properties of the PO-heparin in the golden hamster model of NiV infection, which closely reproduces the NiV pathogenesis in humans [20]. While all non-treated animals succumbed to the infection in less than 6 days, survival of PO-heparin-treated group was increased (Fig. 5B), suggesting thus potential anti-viral properties of heparin like molecules *in vivo*.

Discussion

Rapid dissemination of Nipah and Hendra viruses in infected host may play a critical role in high Henipavirus pathogenicity. This report reveals HS as a cell surface attachment receptor for both NiV and HeV, implicated in the transinfection properties of leukocytes as well as in Henipavirus infection *in cis*. HS has been shown to bind many different viruses by interacting with either one or more viral glycoproteins. Interaction between HS and HIV-1 envelope glycoprotein gp120 [21,22] and with vaccinia virus A27L protein [23] has been demonstrated. Furthermore, HS could bind measles virus hemagglutinin (H) [24], and the fusion (F) proteins of respiratory syncytial virus (RSV) [25] and human metapneumovirus [26]. In the case of bovine RSV and canine distemper virus, both H and F seem to interact with HS [27,28]. Our results suggest that NiV G interacts with HS. Although VSV G protein has been shown to interact with HS [29], our SPR analysis indicated that binding of NiV G to HS is of higher affinity. Further studies using recombinant soluble viral G protein should give better insights into the biochemical characteristics of this interaction and identify binding sites on both ligands. HS has been previously suggested to capture, protect and transmit HIV-1 [9] and HTLV1 [10] *in trans*. Similarly to what was shown for HIV-1 [21], the other sulfated GAGs such as CS or DS were inactive, implying that structural features beyond charge density on the polysaccharide backbone could be important for the activity. Implication of different HS binding sites may be involved, as shown recently with papillomavirus, where sequential engagement of three different HS binding sites leads to virus attachment, interaction with the receptor and entry into cell [30]. Likewise, HS stabilizes varicella zoster virus, making it more accessible to bind its entry receptor [31].

Thus, similarly to its role in the other viral infections, HS could improve the contact of Henipavirus with the host cells so as to help the virus to reach the cellular receptors EFN-B2 or B3 (summarized schematically in Fig. 6).

We observed that heparin inhibits the Henipavirus transinfection *in vitro*. Owing to its capacity to bind multiple cell surface proteins via negatively charged sulfated groups [14], heparin could prevent Henipavirus attachment to cell surface HS. As it is more sulfated than HS, it could also bind viruses with higher affinity than HS and thus act as an efficient competitive inhibitor for virus binding. Furthermore, heparin significantly reduces direct virus infection *in cis* in addition to affecting infection *in trans*. This effect may also result from the interaction between heparin and Henipavirus receptors, as evidenced by SPR for EFN-B3 and in agreement with a recent report [17]. These results allowed us proposing a model for the role of HS in Henipavirus binding and entry and possible interference of heparin with viral infection (Fig. 6). In addition to the inhibition of Henipavirus infection by binding to either viral G glycoprotein or viral entry receptors, heparin may significantly limit virus spreading within the organism by blocking the binding to the attachment receptor HS, and consecutive transinfection of permissive cells.

The mechanism by which heparin devoid of anticoagulation properties [13] restrains virus infectivity *in vivo* most likely depends on the combination of its different biological activities. In addition to affecting Henipavirus infection *in cis* and *in trans*, heparin could constraint inflammation and consequent tissue damage by binding various inflammatory molecules. Indeed, both heparin and HS bind to important immunoregulatory molecules such as the chemokine CXCL10 [32] which is strongly up-regulated during NiV infection [33]. Moreover, as heparin is a heavily sulfated electronegative molecule, it might enhance anti-adhesive property of the endothelium against leukocytes [34]. This effect may rely on the ability of heparin to bind directly to several adhesion molecules, expressed during inflammation, including L-selectin [35], CD11b/MAC1 [36], or P-selectin [37]. Finally, heparin-like derivatives can stabilize the endothelium [38] and help in blocking the passage through the blood brain barrier of both humoral and cellular immune factors, as well as viruses [14,39]. This process may also contribute to the anti-viral effect observed during *in vivo* experiment, providing thus altogether “proof of concept” for further development of this anti-viral approach.

Heparin-mediated inhibition of Henipavirus infection both *in vitro* and *in vivo* suggested anti-viral potential of this GAG, already used in clinic as an anticoagulant for more than 50 years, and well tolerated. Indeed, heparin treatment reduces NiV infection in a hamster animal model, opening thus interesting therapeutic perspectives to complement treatment of this highly lethal infection. Acute nature of Henipavirus infection makes it additionally more prone to the regulatory action of heparin, compared to some chronic infections, including HIV or HTLV, where heparin showed *in vitro* anti-viral activity [9,10]. HS mimetic PI-88 has already been shown to have the significant beneficial effect *in vivo* in the outcome of dengue and encephalitic flavivirus infections [40]. The use of derivatives, that mimic heparin/HS structure [41] or polyanionic compounds with longer half-life *in vivo* [38], devoid of anticoagulant activity and with potentially higher affinity to henipavirus G protein, may further improve therapeutic effects.

Altogether, this study reveals new HS-henipavirus interaction involved in the henipavirus infection and dissemination within the host. It may allow NiV and HeV binding to different circulating cells to use them as a cargo for an efficient spreading within the organism and to target cells for accumulation at their surface enhancing the efficacy of infection *in cis*. These results uncover heparin sulfate as a potential therapeutic target for the development of novel approaches against these highly lethal infections. Additionally, proposed concept of interference using heparin opens perspective of co-treatment based on polysaccharides derivated from HS family or sharing similar motifs showing higher capacity of interaction with henipavirus. In this context, heparin or its derivatives may be used in a metaphylaxis approach of potentially infected animals before appearance of clinical symptoms, during regular Hendra equine epizootics in Australia [3].

Materials and Methods

Ethics Statement

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the French national charter on the ethics of animals, and all efforts were made to minimize suffering. Animal work was approved by the Regional ethical committee CECCAPP (P4_2010_008) and experiments were performed in the INSERM Jean Mérieux BSL-4 laboratory in Lyon, France (French Animal regulation comitée N° A69 387 05 02).

Cell culture

Chinese hamster ovary (CHO) cell line K1 and CHO pgsA-745 cells stably transfected with human ephrin-B2 and B3, (pgsA-EFNB2 and pgsA-EFNB3 [7] were maintained in F12 medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg streptomycin, 10 mM HEPES, and 2 mM L-glutamine at 37°C in 5% CO2. Vero E6, HS deficient CHO-K1 cells: CHO pgsA-745, CHO pgsB-619 and CHO pgsD-677 [15], HeLa cells and stable transfected HeLa with phCMV-Nipah-G-Neo and phCMV-Nipah-F-Neo, expressing NiV G and F proteins respectively (HeLa-G and HeLa-F) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented as above. Human peripheral blood was obtained from 20 different healthy donors from the Blood Transfusion Centre (Lyon, France). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density Ficoll/Hypaque gradient centrifugation, and then centrifuged through a 50% Percoll gradient (Pharmacia Fine Chemicals) for 20 min at 400g. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were recovered from the high-density fraction. For SPR analysis, cells were detached by Versene treatment and washed twice with HBS-P buffer.

Virus infection and titration

Nipah virus (isolate UMMC1; GenBank AY029767) (42), recombinant NiV expressing enhanced green fluorescent protein [42] and Hendra virus (Australia/horse/1994) obtained from Porton Down laboratory UK, were prepared on Vero-E6 cells as described previously [43] and infection virus was used in INSERM Jean Mérieux BSL-4 laboratory in Lyon, France. All cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1, for 1H at 37 °C, washed twice, and observed by inverted and/or fluorescence microscopy daily or harvested for RNA isolation or for use in transinfection assays. At the indicated times p.i., 150 µl of cell culture supernatant were collected and frozen prior to viral titration. Viral titration was performed by plaque assay as detailed elsewhere [44]. The viral infection in co-cultures of leukocytes and CHO with Vero cells was determined using a previously described infectious-center assay in 6-well plates [45], after 20 min formaldehyde fixation and crystal violet staining. Alternatively, in heparin-mediated inhibition assays, titrations were directly performed by plaque assay, using Vero cells or CHO-pgsA745-EFN-B2 or -B3 cells monolayer. Pseudotyped viral particles, containing either NiV G and F or control vesicular stomatitis virus (VSV) G were produced using Friend–murine leukemia virus (MLV) particles and 293T cells, as described previously [8].

Treatment of cells with sodium chlorate

Vero cell monolayers were grown to confluence and then maintained in DMEM medium supplemented with 10% FCS and sodium chlorate ($NaClO_3$) (25, 50 and 75 mM) for 48 h to inhibit HS sulfation in cells, as rapid turnover of proteoglycans in the cells (47) required prolonged incubation with $NaClO_3$. Cells were then detached by trypsin-EDTA 0.05%, distributed into new 6-well tissue culture plates and grown to confluence in the presence of the same range of concentration of $NaClO_3$, and infected with either NiV or HeV (50 or 100 PFU/well). Following 72 h incubation in CMC/DMEM medium supplemented with 3% FCS and $NaClO_3$, virus was titrated using crystal violet staining.

Transinfection assay

Cells were put in contact with virus (MOI=1) for 1h at 37 °C, 5% CO_2. After two washes with PBS, cells were cultured at 37 °C for 24 h and then collected and washed, and 10-fold serial dilutions were added to cell monolayers of Vero cells for determination of cell-associated infectious NiV, using the infectious-center assay, as described previously [8]. In some experiments, cells were incubated for 1 h at 37 °C with 10 U/ml of heparinase 3 (Sigma) and washed 3 times before contact with NiV. Treatment with heparin (porcine intestinal mucosa, Sigma) of either cells or virus and pseudotyped viral particles was performed for 30 min at 37 °C. In heparin pre-treatment experiments, after incubation with heparin, cells were thoroughly washed before adding the virus. In heparin post-treatment experiments, NiV-resistant cells were initially put in contact with either NiV or HeV for 1 h and incubated with heparin afterwards, for 30 min at 37 °C, washed and analyzed in transinfection assay as described above.

Surface Plasmon Resonance (SPR)-based binding assays

SPR experiments were performed on a BIAcore X (for analysis of cells and pseudotyped viral particles and a BIAcore 3000 (for pseudotyped viral particles and recombinant EphrinB3), using CM4 (for pseudotyped virus and recombinant EFN-B3) and CM5 (for cells) sensorchips, and HBS-P buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% surfactant P20, pH 7.4). HS (Celsus, Cincinnati, USA), HP (Sigma) and DS (Sigma) were biotinylated and immobilized on BIAcore sensorchips, as described before [46]. Briefly, two flowcells were activated with a mix of 0.2 M N-ethyl-N'-(diethylaminopropyl)-carbodiimide

(EDC) and 0.05 M N-hydroxy-succimide (NHS). Then, streptavidin (50 µg/mL in 10 mM acetate buffer, pH 4.5) was injected over the activated flow cells, to get an immobilization level of ~2500 response units (RU). One of these flowcells served as negative control, while biotinylated HP, HS or DS were injected on the other flowcells, to get suitable immobilization levels (50-70 RU for recombinant human Ephrins B3 Fc and pseudotyped viral particles analysis, 200 RU for cells). Interaction assays were performed at a flow rate of 5 µl/min and involved 5-10 min injections of sample over the HP and negative control surfaces, followed by a 5 min washing step with HBS-P buffer to allow dissociation of the complexes formed. At the end of each cycle, GAG surfaces were regenerated by sequential injections of 0.05% SDS (1 min) and 2 M NaCl (2.5 min). Typical sample concentrations used were of 10 µg/ml for recombinant human Ephrin-B3-Fc (R&D systems), 1-2.4x107 particles/ml for pseudotyped viral particles and 0.5-0.7x106 cells/ml for CHO-pgsA745 and HeLa cell transfectants. Sensorgrams shown correspond to on-line subtraction of the negative control to the GAG surface signal. Competition assays were performed by pre-incubating NiV pseudoparticles with GAGs (1-10 µg/ml, final concentration) for 15 min prior to injection.

RNA isolation and RT-qPCR

RNA was isolated from cells and plasma using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) in RLT buffer, according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 0.5 µg of total RNA using oligo(dT) and random hexamer oligonucleotide primers (iScript cDNA synthesis kit; Bio-Rad) and run in a Biometra T-Gradient PCR device, and cDNAs were diluted 1/10. Quantitative PCR was performed with cDNA samples using Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG with a ROX kit (Invitrogen). qPCR was run on the StepOne plus PCR system (Applied Biosystems) as follows: 95 °C for 5 min and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, followed by a melting curve up to 95 °C at 0.8 °C intervals. All samples were run in duplicate, and the results were analyzed using StepOne software v2.1. The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as a housekeeping gene to normalize the samples. GAPDH and standard references for the corresponding genes were included in each run to check for RNA integrity, RNA load, and inter-PCR variations. After normalization, the results were expressed as the mRNA copy numbers of the gene of interest per µg of analyzed RNA. All calculations were done using the 2??CT model [47], and experiments were performed according to the MIQE guideline [48]. Primer used: NiV N

forward, GGCAGGATTCTTCGCAACCATC, and reverse, GGCTCTTGGGCCAATTTCTCTG; murine GAPDH forward, GCATGGCCTTCCGTGTCC, and reverse, TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT. EFN-B2 forward, CAAGTTCTGCTGGATCAA, and reverse, GATGTTGTTCCCCGAATG, EFN-B3 forward, ATGGAAAGAGACCGAGGG, and reverse, GAGGTTGCATTGCTGGTG.

Production of heparin devoid of anticoagulant activity (PO-heparin)

To eliminate its anticoagulant properties, heparin was treated with periodate, as previously described [49]. Briefly, 100 mg of heparin from porcine intestine (Sigma, 185.8 USP Units mg-1) was dissolved in 900 µl of 0.1 M NaIO4 in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5) and stirred at 4 °C for 3 days. The unreacted NaIO4 was then neutralized by addition of glycerol (25 µl), dialyzed against H2O and lyophilized. The sample was resuspended in 800 µl of 0.2 M NaBH4 in 0.25 M ammonium bicarbonate and incubated for a further 3 h at 4 °C. After acidification with glacial acetic acid (to eliminate remaining NaBH4), the reaction mixture was neutralized by addition of NaOH (1 M), dialyzed against water and lyophilized.

Infection of hamsters

Eight-week-old golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, Janvier, France) were anesthetized and infected intraperitoneally (i.p.) with 0.4 ml containing NiV, 500 LD50 preincubated with heparin (0.5 mg/ml, 30 min at 37 °C). Groups of 5 animals, were treated daily subcutaneously with the PO-heparin (10 mg/kg) for 12 days, starting from the day of infection. Animals were followed daily for 3 weeks.

Statistical analysis

Data were expressed as mean + standard deviation (SD) or as a percentage of survival. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U-test and Mantel-Cox test using Graph Pad Prism4 software.

Acknowledgements

We thank I. Bally and N. Thielens, from the IBS platform of the Partnership for Structural Biology and the Institut de Biologie Structurale in Grenoble, for assistance and access to the Biacore facility, and members of the group “Immunobiology of Viral Infections” for their help during the realization of the study. We are also grateful to Dr. B. Lee for

providing us EFN B2 and B3-CHO transfected cells. We also thank to D. Cornec, F. Jacquot, A. Duthey, A. Valve, L. Barrot and other biosafety team members from INSERM BSL4 “Jean Mérieux” for their assistance.

Author contributions

CM, KPD, RRV designed and performed the experiments and analyzed data. MC, DN and SM performed experiments. BH, CM and KPD designed the studies, analyzed data and wrote the paper. DG, FLC and HR provided conceptual advices and critical analysis of the results. HR provided the BSL4 environment and important advices for the studies.

Funding: This work was supported by INSERM, ANR-09-MIEN-018-01 and ANR-ASTRID-2011 and C.M. was supported by Cluster of Infectiology Rhone-Alpes and K.D. by DGA/INSERM research fellowship. Founders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of manuscript.

References:

1. Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A, et al. (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. Science 268: 94-97.

2. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, et al. (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288: 1432-1435.

3. Marsh GA, Wang LF (2012) Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly? Curr Opin Virol 2: 1-6.

4. Lam SK (2003) Nipah virus--a potential agent of bioterrorism? Antiviral Res 57: 113-119.

5. Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Mungall BA, et al. (2005) Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 10652-10657.

6. Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, et al. (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. Nature 436: 401-405.

7. Negrete OA, Wolf MC, Aguilar HC, Enterlein S, Wang W, et al. (2006) Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. PLoS Pathogens 2: e7-e7.

8. Mathieu C, Pohl C, Szecsi J, Trajkovic-Bodennec S, Devergnas S, et al. (2011) Nipah Virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. Journal of Virology 85: 7863-7871.

9. Bobardt MD, Saphire ACS, Hung H-C, Yu X, Van der Schueren B, et al. (2003) Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. Immunity 18: 27-39.

10. Pinon JD, Klasse PJ, Jassal SR, Welson S, Weber J, et al. (2003) Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. Journal of Virology 77: 9922-9930.

11. Vives RR, Lortat-Jacob H, Fender P (2006) Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe? Current gene therapy 6: 35-44.

12. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, et al. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annual review of biochemistry 68: 729-777.

13. Bourin MC, Lindahl U (1993) Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. Biochem J 289 (Pt 2): 313-330.

14. Lever R, Page CP (2002) Novel drug development opportunities for heparin. Nature Reviews Drug Discovery 1: 140-148.

15. Rostand KS, Esko JD (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. Infection and Immunity 65: 1-8.

16. Spillmann D (2001) Heparan sulfate: anchor for viral intruders? Biochimie 83: 811-817.

17. Holen HL, Zernichow L, Fjelland KE, Evenroed IM, Prydz K, et al. (2010) Ephrin-B3 binds to a sulfated cell-surface receptor. The Biochemical Journal 433: 215-223.

18. Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD (1976) The separation of active and inactive forms of heparin. Biochemical and Biophysical Research Communications 69: 570-577.

19. Kusche M, Bv§ckstrvðm G, Riesenfeld J, Petitou M, Choay J, et al. (1988) Biosynthesis of heparin. O-sulfation of the antithrombin-binding region. The Journal of Biological Chemistry 263: 15474-15484.

20. Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M, et al. (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. The American Journal of Pathology 163: 2127-2137.

21. Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ (1998) Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. Journal of Virology 72: 3623-3634.

22. Vives RR, Imberty A, Sattentau QJ, Lortat-Jacob H (2005) Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. The Journal of Biological Chemistry 280: 21353-21357.

23. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W (1998) A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. Journal of Virology 72: 1577-1585.

24. Terao-Muto Y, Yoneda M, Seki T, Watanabe A, Tsukiyama-Kohara K, et al. (2008) Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. Antiviral Research 80: 370-376.

25. Feldman SA, Audet S, Beeler JA (2000) The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. Journal of Virology 74: 6442-6447.

26. Chang A, Masante C, Buchholz UJ, Dutch RE (2012) Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. Journal of Virology 86: 3230-3243.

27. Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, et al. (2007) Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. Virology 359: 324-335.

28. Karger A, Schmidt U, Buchholz UJ (2001) Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. The Journal of general virology 82: 631-640.

29. Guibinga GH, Miyanohara A, Esko JD, Friedmann T (2002) Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 5: 538-546.

30. Richards KF, Bienkowska-Haba M, Dasgupta J, Chen XS, Sapp M (2013) Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. Journal of Virology 87: 11426-11437.

31. Zhu Z, Gershon MD, Ambron R, Gabel C, Gershon AA (1995) Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 3546-3550.

32. Ranjbaran H, Wang Y, Manes TD, Yakimov AO, Akhtar S, et al. (2006) Heparin displaces interferon-gamma-inducible chemokines (IP-10, I-TAC, and Mig) sequestered in the vasculature and inhibits the transendothelial migration and arterial recruitment of T cells. Circulation 114: 1293-1300.

33. Mathieu C, Guillaume V, Sabine A, Ong KC, Wong KT, et al. (2012) Lethal Nipah virus infection induces rapid overexpression of CXCL10. PLoS ONE 7: e32157.

34. Floris S, van den Born J, van der Pol SMA, Dijkstra CD, De Vries HE (2003) Heparan sulfate proteoglycans modulate monocyte migration across cerebral endothelium. Journal of neuropathology and experimental neurology 62: 780-790.

35. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A (1998) Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. J Clin Invest 101: 877-889.

36. Salas A, Sans M, Soriano A, Reverter JC, Anderson DC, et al. (2000) Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. Gut 47: 88-96.

37. Skinner MP, Lucas CM, Burns GF, Chesterman CN, Berndt MC (1991) GMP-140 binding to neutrophils is inhibited by sulfated glycans. J Biol Chem 266: 5371-5374.

38. Urbinati C, Chiodelli P, Rusnati M (2008) Polyanionic drugs and viral oncogenesis: a novel approach to control infection, tumor-associated inflammation and angiogenesis. Molecules (Basel, Switzerland) 13: 2758-2785.

39. Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, et al. (2004) Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. Journal of Virology 78: 6567-6584.

40. Lee E, Pavy M, Young N, Freeman C, Lobigs M (2006) Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. Antiviral Research 69: 31-38.

41. Cagno V, Donalisio M, Civra A, Volante M, Veccelli E, et al. (2014) Highly sulfated K5 Escherichia coli polysaccharide derivatives inhibit respiratory syncytial virus infectivity in cell lines and human tracheal-bronchial histocultures. Antimicrobial agents and chemotherapy.

42. Yoneda M, Guillaume V, Ikeda F, Sakuma Y, Sato H, et al. (2006) Establishment of a Nipah virus rescue system. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 16508-16513.

43. Guillaume V, Wong KT, Looi RY, Georges-Courbot M-C, Barrot L, et al. (2009) Acute Hendra virus infection: Analysis of the pathogenesis and passive antibody protection in the hamster model. Virology 387: 459-465.

44. Guillaume V, Lefeuvre A, Faure C, Marianneau P, Buckland R, et al. (2004) Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). J Virol Methods 120: 229-237.

45. Horvat B, Rivailler P, Varior-Krishnan G, Cardoso A, Gerlier D, et al. (1996) Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. J Virol 70: 6673-6681.

46. Vivès RR, Sadir R, Imberty A, Rencurosi A, Lortat-Jacob H (2002) A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization. Biochemistry 41: 14779-14789.

47. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: e45.

48. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55: 611-622.

49. Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, et al. (2002) Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. British journal of cancer 86: 1803-1812.

Figures and Legends :

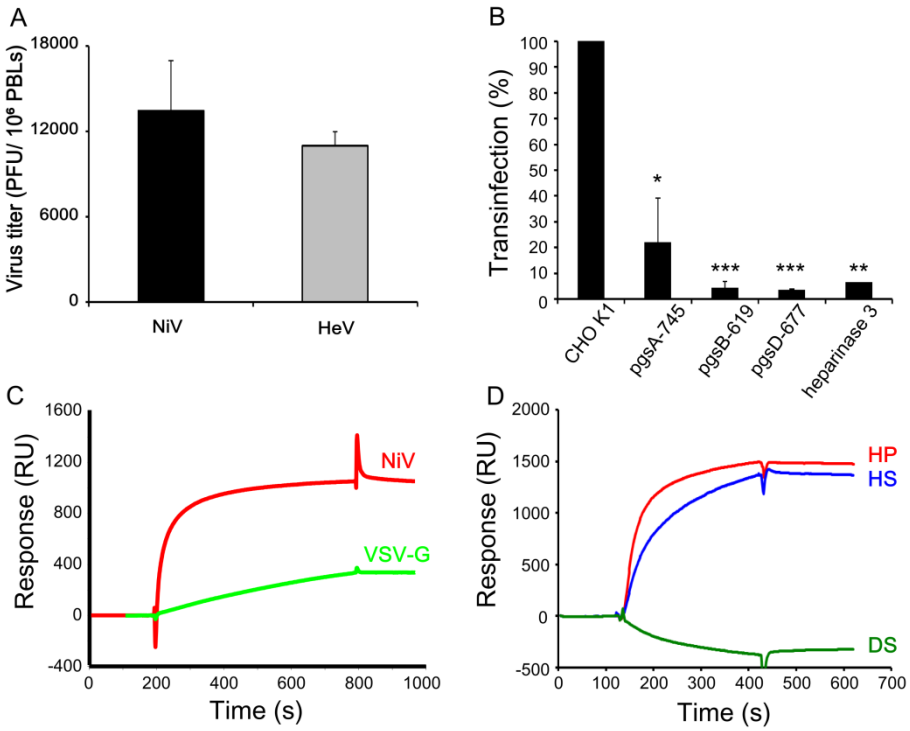


Figure 1. Transinfection of henipaviruses requires the expression of HS. (A) Lymphocyte-mediated transinfection of NiV and HeV. PBLs were incubated with either NiV or HeV, washed, cultured for 24 h and then transferred to Vero cell monolayer, used for the determination of the viral titer after 4 days of coculture, by the infectious center assay. (B) CHO-K1 cells, treated or not with heparinase 3 and three HS-deficient CHO lines, pgsA-745, pgsB-619 and pgsD-677, were incubated with NiV and analysed for their capacity to transmit the infection to susceptible Vero cells *in trans*. Results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells ± SD (*P<0.05, ***P<0.001, Mann-Whitney U-test). (C) SPR analysis of the binding of MLV pseudotyped either with VSV-G (in green) or with NiV glycoproteins G and F (in red) to HP-activated sensorchip surface. (D) SPR analysis of the binding of NiV G+F pseudoparticles to either heparan sulfate (HS, in blue), Dermatan sulfate (DS, in green) or heparin (HP, in red) -activated surface. The binding response in resonance units (RU) was recorded as a function of time; results from 1 out of 3 experiments are presented.

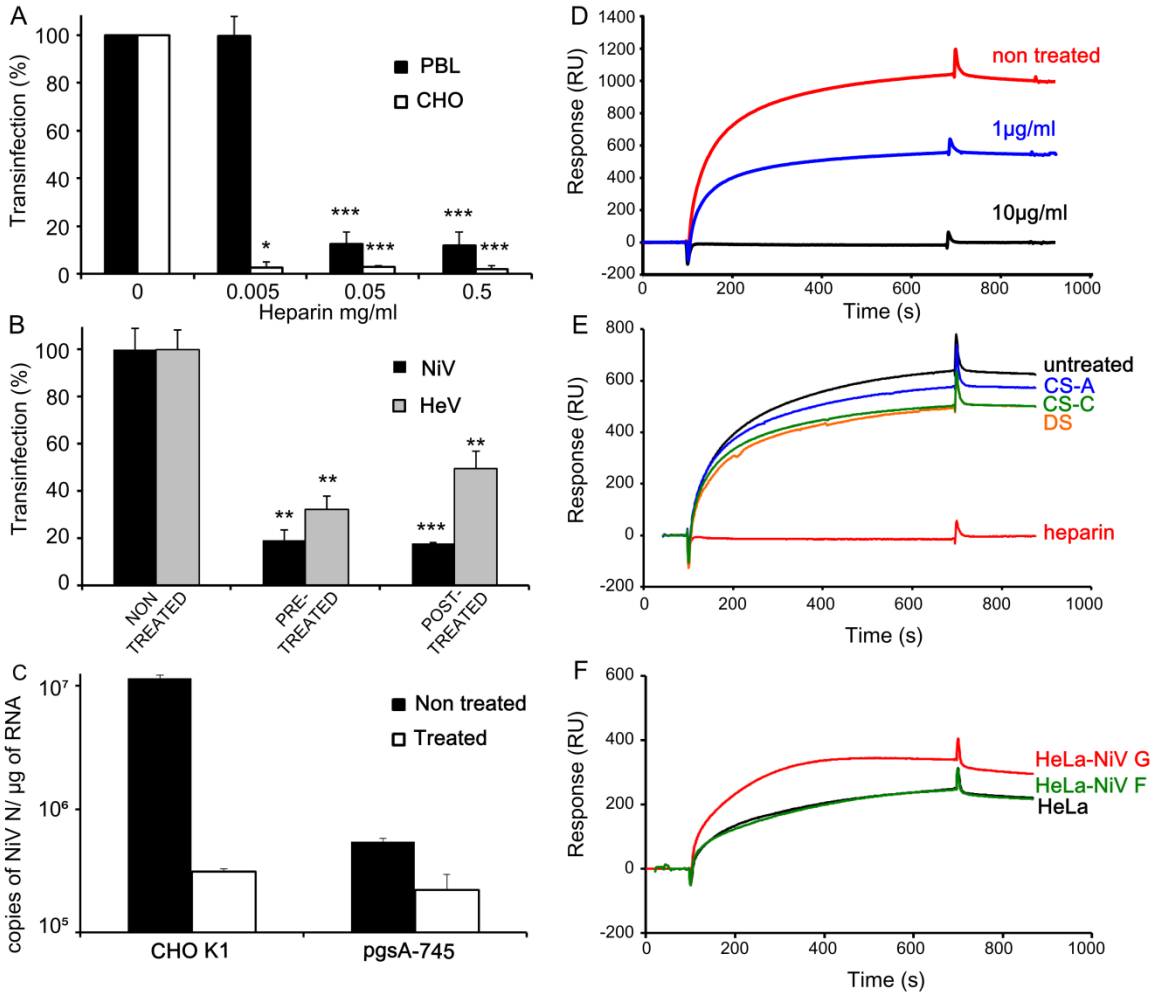


Figure 2. Heparin inhibits the interaction between Henipavirus and HS. (A) PBLs or CHO-K1 cells were incubated 30 min with the indicated doses of heparin before being put in contact with NiV. (B) PBLs were treated with 0.5 mg/ml of heparin before contact with either NiV or HeV (pre-treatment) or after 1 h of incubation with the virus (post-treatment). (C) Analysis of NiV binding to CHO-K1 and HS-deficient CHO-pgsA-745 cells pre-treated or not with heparin (0.5 mg/ml). Cells were put in contact with NiV for 24h and the number of viral RNA (N gene) copies was determined by RT-qPCR. Results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells ±SD (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, Mann-Whitney U-test). (D) SPR analysis of the NiV pseudoparticles binding to HP-activated surface in absence (in red) or presence of soluble heparin at 1 µg/ml (in blue) and 10 µg/ml (in black). (E) SPR analysis of the binding of NiV pseudoparticles to HP-activated sensor chips, after pre-incubation with either PBS (black), or 10 µg/ml of soluble heparin (red), chondroitin sulfate A (CS-A, blue), chondroitin sulfate C (CS-C, green) or dermatan sulfate (DS, orange). (F) SPR analysis of the binding of HeLa cells (black), HeLa-NiV F (green) and HeLa-NiV G (red) to HP-

activated sensor chips. The binding response in resonance units (RU) was recorded as a function of time and results from 1 out of 3 experiments are presented.

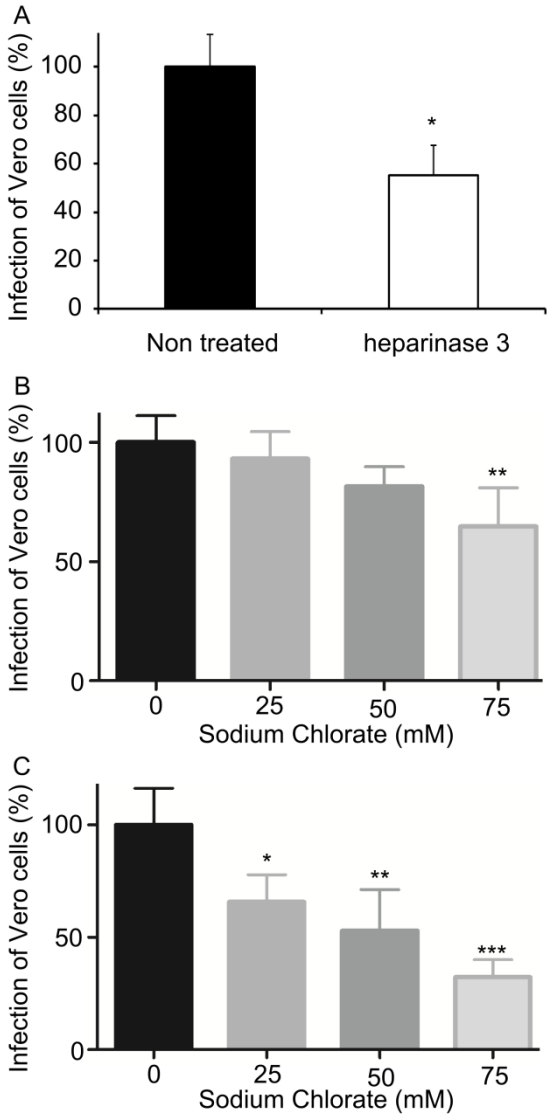


Figure 3. HS plays a role in Henipavirus infection. (A) Vero cells were either treated with heparinase 3 or left untreated prior to NiV infection. Titration was performed 3 days later by plaque assay. (B, C) Vero cells were treated with increasing concentration of sodium chlorate for 48 h and then infected with either NiV (B) or HeV (C) and titration was performed 3 days later by plaque assay. Results are expressed as a percentage of non-treated controls from triplicate cultures ±SD (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.01, Mann-Whitney U-test).

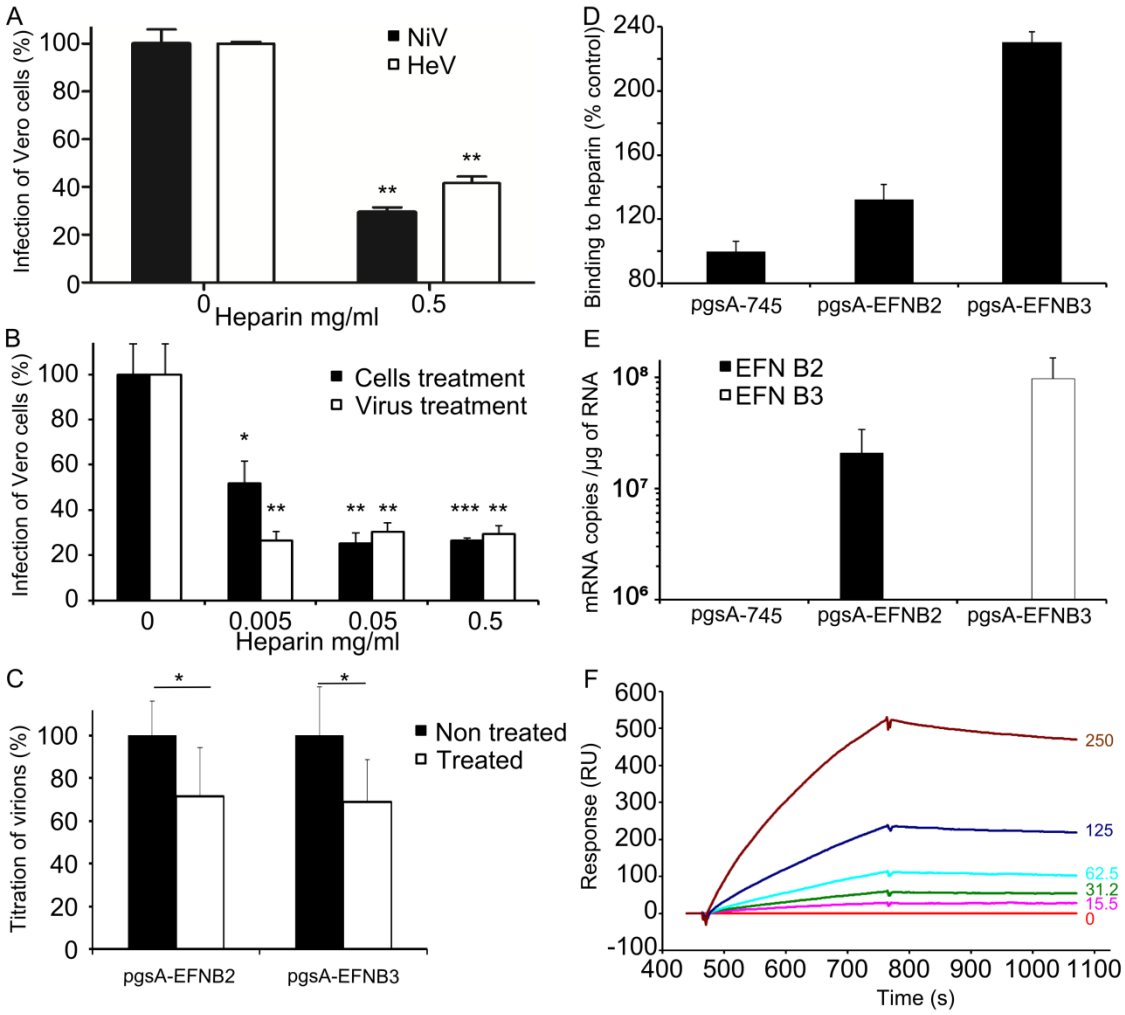


Figure 4. Heparin inhibits the infection by preventing viral binding to EFN-B2 and B3. (A) Vero cells were treated with heparin before infection with NiV or HeV. Results are expressed as a percentage of nontreated controls. (B) Vero cells were treated with increasing concentration of heparin before infection with NiV; alternatively, virus was incubated with heparin before contact with cells. Viral titration was performed using plaque assay and results are expressed as a percentage of nontreated controls. (C) NiV infection of CHO-pgsA-745-EFN-B2 or EFN-B3 cells, pre-treated with heparin (0.5 mg/ml, 30 min, 37 °C) and analysed by plaque assay. Results are expressed as mean percentage of non-treated controls ±SD of 8 different experiments; (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.01, Mann-Whitney U-test). (D) SPR analysis of binding of CHO-pgsA-745, CHO-pgsA-745-EFN-B2 and CHO-pgsA-745-EFN-B3 to heparin. Results are presented as the mean ± SD of 4 independent experiments. (E) Quantification of EFN-B2 and EFN-B3 mRNA expression in stably transfected CHO-pgsA-745 cells by RT-qPCR. (F) SPR analysis of the binding of indicated concentrations

of soluble EFN-B3, injected over HP-activated sensor chips, analysed in triplicates. The binding response in resonance units (RU) was recorded as a function of time.

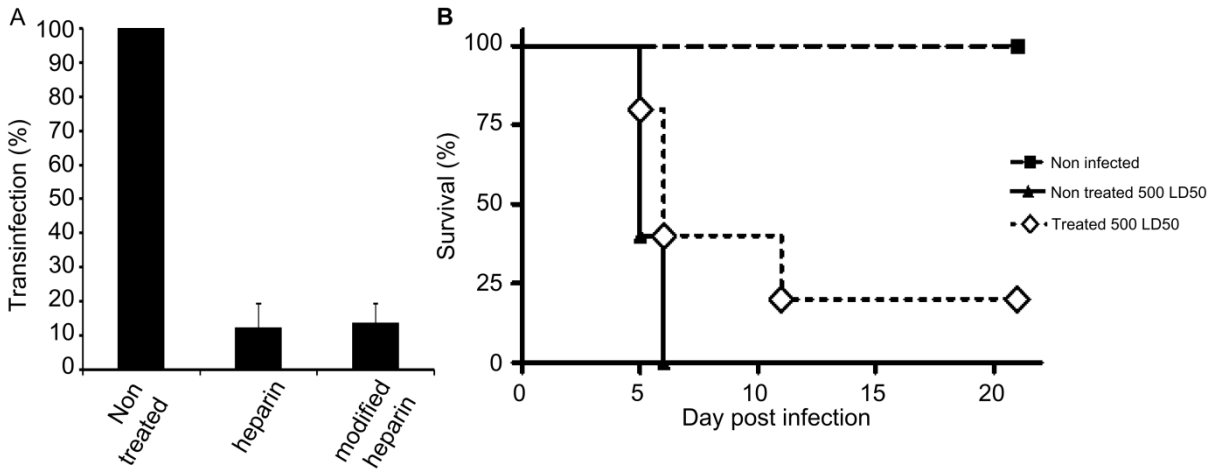


Figure 5. Anti-viral effect of PO-heparin. (A) *In vitro* comparison of the inhibitory effect of heparin and PO-heparin (0.5 mg/ml) on transinfection ability of leukocytes treated before contact with NiV. NiV titer was measured by the infectious center assay and results are expressed as a percentage of inhibition compared to untreated cells. (B) Groups of 5 hamsters were either left untreated or treated daily by subcutaneous injections of PO-heparin (10 mg/kg) for 12 days. Animals were infected intraperitoneally with 500 LD50 of NiV on the first day of treatment and followed during 3 weeks. The results are expressed as percentage of surviving animals in each group. The survival was significantly increased in the group of treated animals (p=0,017, Mantel Cox test).

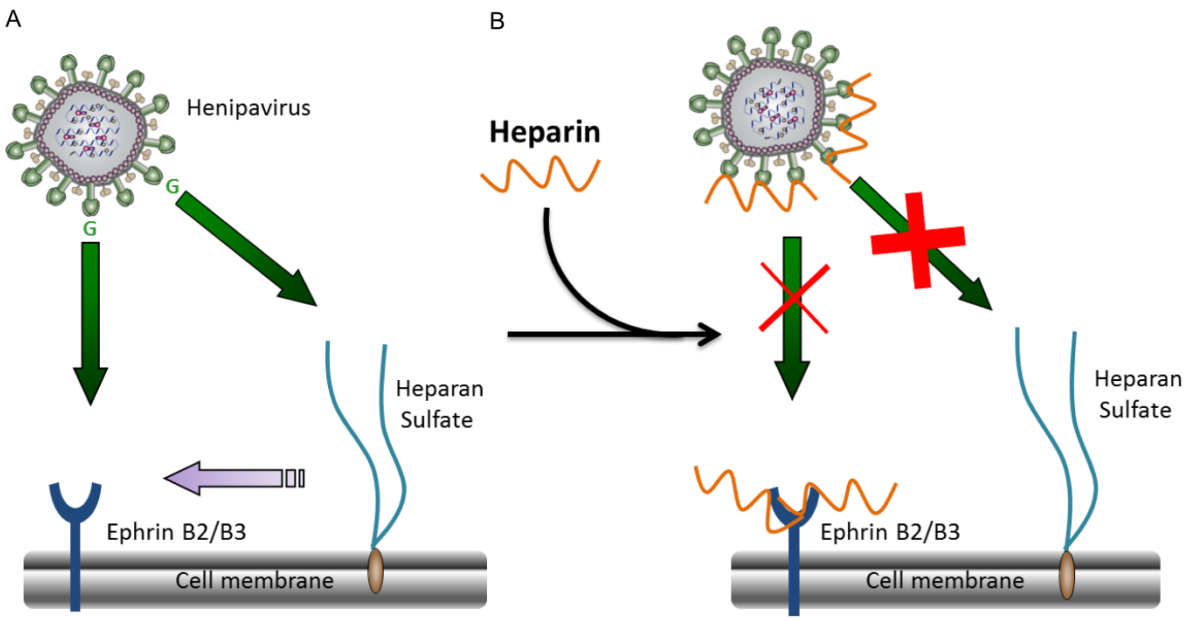


Figure 6. Schematic presentation of possible implication of heparan sulfate (HS) and heparin in Henipavirus infection. (A) NiV and HeV interact with their entry receptors, EFN-B2 and B3, and with HS. While the first interaction is important for virus infection *in cis*, the second leads to the infection *in trans* and may facilitate virus dissemination in the host. In addition, HS may help the virus to reach its entry receptor and accumulate at cell surface and/or stabilize the interaction with EFN B2/B3. (B) Heparin binds henipavirus G protein as well as ephrin receptors and may thus displace the virus from the cell surface and prevent it from reaching its entry receptors. Consequently, heparin inhibits infection *in trans* and restrains the direct infection *in cis*, respectively.

Partie IV. Etude de la pathogénèse des Henipavirus chez la souris.

I. Intérêts et limites des modèles animaux existants

Parmi les modèles animaux existants, le hamster doré et les singes sont les seuls dont l'étude présente un réel intérêt pour l'avancée des connaissances sur la pathologie humaine liée au virus Nipah. Le cochon d'inde, le furet, le chat et l'embryon de poulet n'ont pas vraiment d'intérêt propre car les signes cliniques et pathologiques ne sont que très partiels et nécessitent l'utilisation de doses infectieuses très élevées. Le porc constitue un excellent modèle pour lui-même, car l'infection est très facilement reproductible en laboratoire, mais n'apporte que peu intérêt pour la modélisation de l'infection chez l'homme. L'analyse détaillée de ces différentes espèces en tant que modèles animaux pour l'infection par les Henipavirus a fait l'objet d'une publication de revue par l'auteur de cette thèse (Kévin P. Dhondt et Horvat, 2013) (cf. annexe).

A. Les primates non-humains

Les primates non-humains constituent d'excellents modèles animaux car ils développent l'ensemble des signes cliniques et pathologiques observés chez l'homme. Ils sont à ce jour les modèles animaux les plus complets et les plus intéressants pour l'étude de la pathologie liée au virus Nipah.

1. Le singe vert africain (*Chlorocebus aethiops*)

Le singe vert africain ou grivet est un modèle animal largement utilisé dans la recherche. Il s'agit d'un singe d'environ 5 kg qui habite les savanes d'Afrique subsaharienne. Son utilisation en tant que modèle pour l'étude de la pathogénèse liée au virus Nipah a été envisagée en raison de la forte capacité du virus à se répliquer dans les cellules Vero, qui sont dérivées du grivet. Lors d'une infection par voie intratrachéale avec des doses allant de $2{,}5.10^3$ ufp à $1{,}3.10^6$ ufp, on observe une mortalité de 87,5 % à 12 jours (Geisbert *et al*, 2010). Les animaux présentent un syndrome de détresse respiratoire aigu associé à la production d'écume sanguinolente dans le nez et la bouche (cf. Figure 21 A).

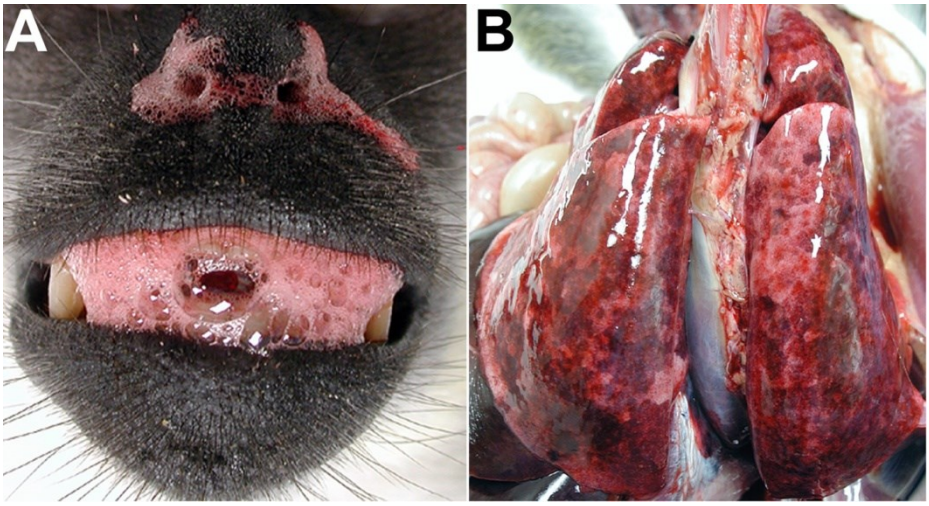


Figure 21 : [A] Sécrétions mousseuses sanguinolentes autour des narines et de la bouche. [B] Poumons hypertrophiés avec de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées. Extrait de (Geisbert et al*, 2010).*

A l'autopsie, les poumons sont hypertrophiés et œdémateux ; ils présentent de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées (cf. Figure 21 B). On retrouve de la fibrine sur les plèvres. La vessie, lieu d'excrétion viral chez la chauve-souris, est particulièrement œdématiée et présente de nombreuses pétéchies. La plupart des organes présentent des signes liés à la vascularite systémique. Le cerveau est sévèrement congestionné avec des hémorragies méningées et de l'œdème (cf. Figure 22 A).

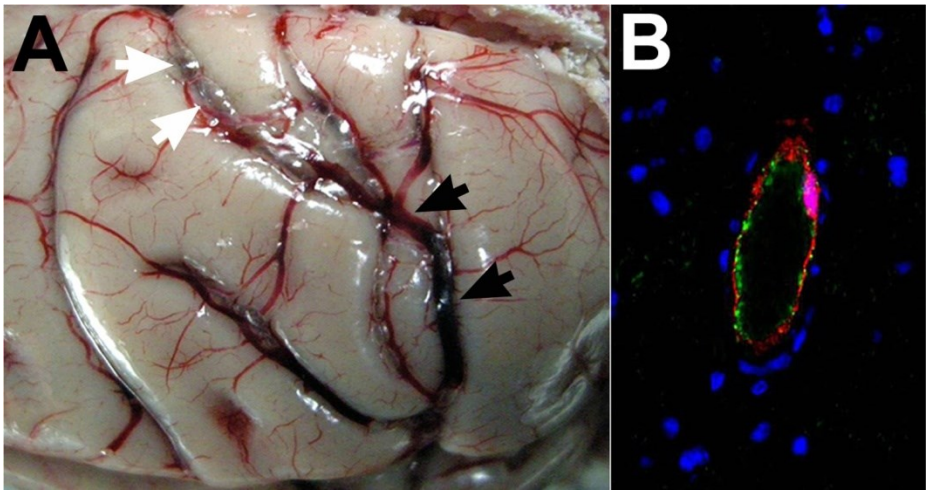


Figure 22 : [A] Cerveau présentant une congestion sévère (flèches noires) avec de possibles hémorragies méningées. Fluide (flèches blanches) suggérant l'existence d'un œdème modéré des méninges. [B] Double marquage d'un vaisseau sanguin cérébral montrant la colocalisation du virus Nipah dans les cellules endothéliales : cellule endothéliale (vert) et antigènes du virus Nipah (rouge), contre-coloration DAPI (bleu). Grossissement x400. Extrait de (Geisbert et al*, 2010).*

On observe à partir de 3-4 jours la formation de syncytia et la présence du virus dans de nombreux organes incluant la langue, les glandes salivaires, le larynx, la trachée, le cœur, la rate, la vésicule biliaire, les reins, les organes reproducteurs, les glandes pituitaires et adrénales, l'estomac, les intestins et les muscles squelettiques. Dans le cerveau, ce sont principalement les neurones et les vaisseaux sanguins qui sont infectés (cf. Figure 22 B).

2. Le saïmiri (Saimiri sciureus)

Le saïmiri est un autre modèle primate très utilisé dans la recherche biomédicale en raison de sa petite taille (environ 30 cm). Il s'agit d'un singe d'Amérique du sud vivant dans les forêts équatoriales. Chez cette espèce, les symptômes apparaissent entre 7 à 19 jours après l'inoculation par voie intranasale ou intraveineuse d'une dose de 10^3 ou 10^7 ufp de virus Nipah (Marianneau *et al*, 2010). Les signes cliniques incluent une anorexie, une perte de poids, un état dépressif, de l'hyperthermie, un syndrome respiratoire aigu, des troubles de la locomotion évoluant vers une perte de conscience, un coma et la mort. Bien que ces signes aient été observés chez tous les animaux infectés, les symptômes semblent durer plus longtemps (7 jours) mais moins sévèrement chez les animaux inoculés par voie intranasale (contre 3 jours pour la voie intraveineuse). A l'autopsie, on observe surtout des lésions inflammatoires pulmonaires. L'histologie montre peu de signes pathologiques et la vascularite systémique est relativement faible. L'immunohistochimie a néanmoins permis de mettre en évidence la présence du virus Nipah dans de multiples organes incluant notamment le cerveau, les poumons, la rate et les reins.

B. Le hamster doré (Mesocricetus auratus)

Comme cité précédemment, le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) a été le premier modèle animal de petite taille validé pour les études de pathologie (Wong *et al*, 2003). Les signes cliniques sont essentiellement neurologiques et systémiques et correspondent à ceux observés chez l'homme : hyperthermie, perte de poids, tremblements, paralysie, myoclonies, léthargie, … La mort survient entre 5 à 9 jours après l'injection intrapéritonéale du virus (100 à 1000 ufp) et 24h après l'apparition des premiers signes cliniques. La dose létale 50 est établie à environ 7 ufp (Yoneda *et al*, 2006). Les lésions observées à l'autopsie concernent majoritairement le cerveau et montrent une forte inflammation associée à des hémorragies et de l'œdème. L'histologie et l'immunohistochimie révèlent la présence du virus Nipah dans de très nombreux organes incluant le cerveau, les poumons, le foie, les

reins et le cœur. Etant donné le fort tropisme endothélial du virus, cette distribution semble tout à fait normale car ce sont des organes fortement irrigués par les capillaires sanguins.

Le hamster constitue donc un excellent modèle animal de pathologie. Il est petit, peu coûteux, facilement manipulable, ne nécessite qu'une faible dose infectieuse et mime très bien la pathologie humaine. Son défaut majeur est lié à l'absence quasi-totale de connaissances et d'outils immunologiques développés pour cette espèce. En effet, contrairement aux rongeurs conventionnels de laboratoire (rats et souris), le génome du hamster n'est que très partiellement séquencé et annoté. Cette limite interdit donc, de fait, toute étude transcriptomique ainsi que la dissection des cascades immunologiques engendrées par la présence du virus. En outre, une grande quantité de réactifs chimiques et immunologiques (anticorps de marquage, inhibiteurs protéiques, …) ne sont disponibles que pour les rats et souris. Il apparait donc nécéssaire de développer de nouveaux modèles pour étudier la physiopathologie du virus et son interaction avec le système immunitaire.

C. La souris (*Mus musculus*)

Un modèle animal idéal pour l'étude des mécanismes physiopathologiques liés à l'infection par le virus Nipah aurait donc été la souris. En effet, comme dit précédemment, les connaissances et les outils sur cette espèce sont nombreux et aisément disponibles. Néanmoins, malgré l'existence des récepteurs Ephrine B2 et B3 sur les cellules murines (Bossart, 2008), la souris ne semble pas infectable par les virus Nipah et Hendra, ni expérimentalement (Wong *et al*, 2003), ni naturellement (Hsu *et al*, 2004; Yob *et al*, 2001).

Dans cette partie, nous proposons une nouvelle approche basée sur l'utilisation de souris déficientes pour différents composants du système inné et adaptatif.

II. La souris transgénique IFNAR KO

La transgénèse fait partie des outils disponibles chez la souris. Cette technique permet notamment, par manipulation génétique et grâce à la connaissance du génome murin, d'anéantir l'expression de certains gènes. On parle alors de gène KO (Knock-Out). Ainsi, selon le gène touché, il est possible de créer des lignées de souris dont certaines fonctions métaboliques ou immunitaires sont modifiées.

C'est le cas de la lignée IFNAR KO. Dans cette lignée murine (A129) rétrocroisée sur un fond génétique C57BL/6, l'expression du récepteur à l'interféron de type I (IFNAR) est annihilée (van den Broek *et al*, 1995). Ainsi, dans ce modèle, la production d'interféron de type I n'est pas abolie mais la signalisation sous IFNAR est inexistante. Un tel modèle nous permet donc d'identifier dans quelles mesures l'IFN-I est un facteur responsable de la résistance naturelle des souris de souches sauvages lors de l'infection par le virus Nipah car le récepteur IFNAR joue un rôle prépondérant dans l'immunité antivirale innée et son absence diminue très fortement le pouvoir de cette réponse. Ce type de modèle a déjà largement été utilisé pour étudier le rôle de la réponse interféron dans les maladies d'origine virale (van den Broek *et al*, 1995; Bray, 2001; Detje *et al*, 2009).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés à évaluer l'intérêt de l'utilisation de ces souris transgéniques (dont l'immunité innée est déficiente) pour l'étude des paramètres physiopathologiques liés à l'infection par les virus Nipah et Hendra. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Infectious Diseases* du 1er janvier 2013 (Dhondt *et al*, 2013).

Cet article ne peut pas être présenté dans cette thèse dans sa version finale pour raison de droit de reproduction. Il est accessible par le lien suivant :

http://jid.oxfordjournals.org/content/207/1/142.long

III. Autres lignées de souris

Après avoir identifié l'interféron de type-I comme critique pour la survie de la souris, nous avons cherché à savoir si d'autres voies de l'immunité innée ou adaptative se révèlent indispensables pour la résistance de cette espèce aux infections à Henipavirus. Nous avons donc utilisé un panel de souris transgéniques ou de souris traitées avec différents composés de façon à obtenir une déficience de certains composants de l'immunité. Cette étude révèle une redondance des voies de détection TLR / RLR mais aussi l'aspect essentiel de l'immunité adaptative, et plus particulièrement de la réponse adaptative cellulaire, dans l'éradication du virus chez la souris.

A. Déficiences de l'immunité innée

L'activation des PRRs conduit à la synthèse d'interféron de type-I que nous avons déjà montré être indispensable à la survie des souris. Nous avons donc utilisé différentes lignées de souris dépourvues de certains des composants essentiels des voies de signalisation de ces détecteurs. Ainsi, nous avons utilisé des souris MyD88 KO, TLR3 KO et MAVS KO pour inhiber chacune des 3 voies complémentaires présentées Figure 9. Les résultats montrent qu'aucune de ces lignées ne présente de signe clinique ni de mortalité. Il y a fort à penser que les voies, particulièrement MyD88 et MAVS dans le cas des Henipavirus, sont redondantes et que l'absence de l'une n'empêche pas la production d'interféron de type-I par les autres voies. Des études complémentaires basées sur l'utilisation d'une lignée de souris double KO MyD88 et MAVS ont permis de révéler que le phénotype de survie IFNAR KO était partiellement restauré chez ces souris et confirme donc la redondance des voies de détection.

Par ailleurs, l'utilisation de souris IFNAR KO est une approche assez drastique sur le rôle de l'interféron de type-I car son action y est abolie dans toutes les cellules. Nous avons donc voulu voir si l'utilisation de souris dont le récepteur IFNAR n'était absent que de certains types cellulaires clés pouvait engendrer de même phénotype que le modèle IFNAR KO suite à l'infection par les Henipavirus. Ainsi, nous avons utilisé des lignées de souris basées sur l'utilisation du système Cre recombinase. Le gène à exciser (en l'occurrence *ifnar*) est flanqué de 2 séquences *flox* reconnues par une Cre recombinase. Le gène de cette Cre recombinase est inséré sous la dépendance d'un promoteur spécifique à un type cellulaire

donné. Ainsi, lorsque la Cre recombinase est exprimée, elle excise le gène d'intérêt. On peut alors générer des lignées de souris dont le KO est conditionnellement restreint à un type cellulaire. Nous avons ainsi testé les lignées suivantes :

- LysM Cre – IFNAR flox : Dans ces souris, le récepteur IFNAR est absent des macrophages et monocytes.
- CD11c Cre – IFNAR flox : Ici, le récepteur IFNAR est absent des cellules dendritiques.
- NK Cre – IFNAR flox : Le récepteur IFNAR est absent des cellules Natural Killer (NK).
- Nes Cre – IFNAR flox : Le récepteur IFNAR est absent des neurones.

Après infection par le virus, les signes cliniques et la mortalité de ces animaux ont été suivi quotidiennement par l'équipe de l'animalerie A4. Aucune de ces lignées n'a présenté de signes cliniques ou de mortalité, suggérant l'importance d'une réponse IFN-I globale plutôt qu'une action très localisée sur les cellules cibles ou les effecteurs de l'immunité innée.

Enfin, le modèle BDCA2-DTR nous a permis de tester l'importance des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) connues pour être les principales cellules productrices d'interféron de type-I. Néanmoins, chez ces souris dont la déplétion des pDC est induite par une injection de toxine diphtérique, aucun signe clinique ni mortalité n'a été observé, suggérant que ces cellules ne sont pas un facteur primordial dans la survie des souris.

B. Déficiences de l'immunité adaptative

Même si l'IFN-I est primordial pour la survie des souris, nous avons voulu vérifier le rôle de l'immunité adaptative. Pour cela, nous avons utilisé deux lignées supplémentaires de souris transgéniques. La lignée RAG2 KO ne possède pas l'enzyme RAG2 capable d'assurer la recombinaison des segments V-D-J à l'origine de la diversité du répertoire des lymphocytes B et T (cf. Figure 23). Ainsi, chez ces souris, ces lymphocytes sont absents et aucune réponse adaptative n'est possible. En plus des défauts immunitaires des souris RAG2 KO, la lignée de souris RAG2 cγ KO ne possède pas la protéine de la chaine commune γ (common gamma chain) aussi connue sous le nom de CD162. Cette protéine est une sous-unité commune des récepteurs à l'interleukine 2 (IL-2), l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. L'absence de cette sous-unité empêche donc la maturation des lymphocytes mais aussi de toutes les cellules lymphoïdes innées (innate lymphoid cells – iLC) dont font partie notamment les cellules Natural Killer (NK), impliquées dans l'immunité innée et les cellules Lymphoid Tissue inducer

(LTi), à l'origine de l'organisation spatiale des organes lymphoïdes secondaires (cf. Figure 23). Le modèle RAG2 cγ KO est un des modèles animaux dont l'immunité est parmi les plus faibles qui soient.

L'infection de ces deux modèles révèle qu'ils sont particulièrement sensibles à l'infection par le virus Nipah par voie intrapéritonéale. Néanmoins, ils présentent des différences de cinétiques tout à fait notables entre eux et vis-à-vis du modèle IFNAR KO. En effet, la mortalité du modèle RAG2 cγ KO est beaucoup plus précoce que celle du modèle RAG2 KO, suggérant un rôle des iLC, mais néanmoins retardée par rapport à celle du modèle IFNAR KO. Pour aller un peu plus loin sur le rôle des iLC, nous avons concentré nos efforts sur les cellules NK. Nous avons donc utilisé un anticorps anti-NK (anti-NK1.1) pour induire une déplétion de ces cellules chez des souris puis les avons infectées avec le virus. Les résultats montrent que l'absence des cellules NK uniquement n'induit pas de signes cliniques. Ainsi, les différences de cinétiques observées entre les modèles RAG2 KO et RAG2 γc KO ne peuvent pas être entièrement expliquées par la seule activité des cellules NK. Un effet collaboratif et synergique peut être envisagé mais le rôle des autres iLC, et particulièrement des LTi, ne peut pas être exclu.

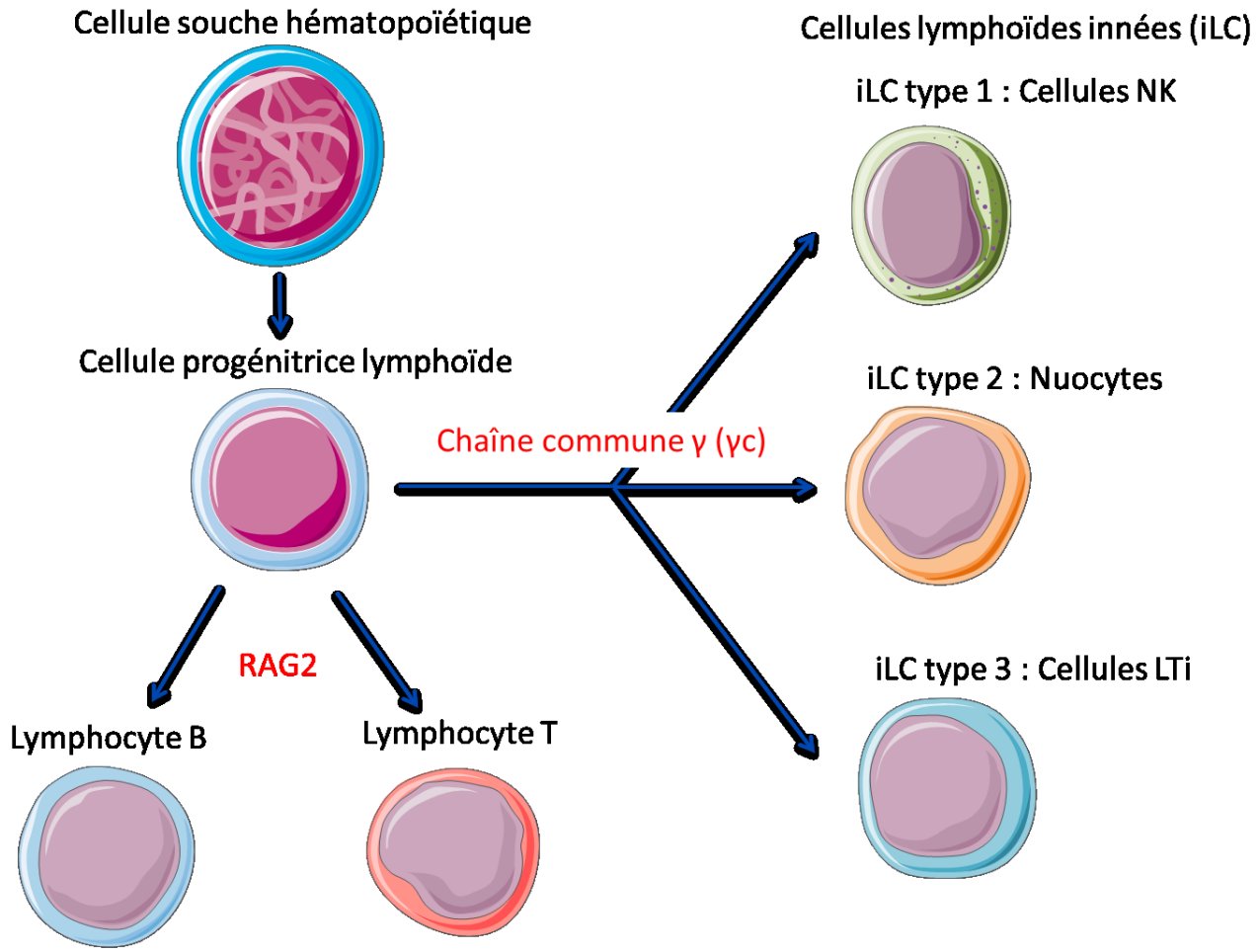


Figure 23 : Voies de la lymphopoïèse. En rouge, protéine dont l'absence entraîne l'arrêt des mécanismes de différentiation de cette voie.

En revanche, le rôle clé des lymphocytes dans la clairance virale est absolument indéniable. Pour définir plus précisément les rôles respectifs des lymphocytes B et T, nous avons utilisé 2 modèles supplémentaires. Les souris µMT KO ne possèdent pas le gène codant pour la chaîne lourde µ des Immunoglobulines (Ig) M. Ceci conduit à l'absence de lymphocytes B matures tout en conservant un système immunitaire inné et adaptatif cellulaire quasi normal. Le modèle complémentaire utilisé pour mieux comprendre le rôle des lymphocytes dans la réaction immunitaire contre le virus Nipah chez la souris est le modèle CD3ε KO. Cette protéine est une sous-unité de la protéine CD3, chargée de la transduction du signal du TCR (T Cell Receptor). Chez ces souris, le développement des lymphocytes T reste bloqué au stade double négatif. Il n'y a donc pas de réponse adaptative cellulaire bien que tous les autres composants du système immunitaire restent fonctionnels.

L'infection de ces souris nous permet d'établir que la réponse adaptative cellulaire, c'est-à-dire liée à la présence des lymphocytes T, est indispensable et prépondérante par rapport à la réponse humorale basée sur les lymphocytes B. En effet, même si la mortalité des souris CD3ε KO est légèrement décalée par rapport aux souris RAG2 KO, suggérant que les anticorps sécrétés par les lymphocytes B toujours présents chez les souris CD3ε KO permettent tout de même de ralentir la progression virale, seules les souris µMT KO survivent à l'infection. Ainsi, la présence des anticorps n'est pas un facteur indispensable à la survie des souris, au contraire des lymphocytes T.

IV. Rôle des macrophages

A. Généralités

Positionnés à l'interface entre réparation tissulaire, immunité innée et immunité adaptative, les macrophages forment une population de cellules très hétérogène dont les rôles sont multiples. Ils peuvent donc intervenir dès l'embryogénèse pour éliminer des zones de tissu superflu (comme celui reliant les espaces interdigités par exemple (Hopkinson-Woolley *et al*, 1994)) ou modeler d'autres tissus tels que les os (Horwood, 2013). Les macrophages jouent aussi un rôle prépondérant dans le contrôle des infections virales, bactériennes et parasitaires. Leur activité de phagocytose, en collaboration avec d'autres composants du système immunitaire, permet la dégradation directe des particules virales et des débris cellulaires mais ils jouent aussi un rôle prépondérant dans la mise en place de l'immunité adaptative grâce aux nombreuses cytokines qu' ils sécrètent et à leur capacité de préparation et de présentation des antigènes.

Historiquement, les macrophages ont été classifiés, selon le même principe que la nomenclature des cellules Th, en 2 catégories opposables : le paradigme des M1 et M2. Ce concept a très souvent été surinterprété comme une classification fonctionnelle rigide et non comme une « approche conceptuelle simplificatrice » (Mantovani *et al*, 2005). Brièvement, les macrophages M1 font partie des macrophages dont l'activation est majoritairement déclenchée par l'IFNγ seul ou en association avec un stimulus microbien (LPS, …) ou des cytokines (TNF, …). Ils sont connus pour être des producteurs efficaces de molécules actives impliquées dans le stress oxydatif ou de cytokines inflammatoires telles que l'IL1-β ou le TNFα. Ils participent à l'élaboration d'une réponse Th1 efficace et luttent

activement contre les parasites intracellulaires et les tumeurs. Les macrophages dits M2 sont quant à eux des macrophages plus impliqués dans l'élaboration d'une réponse de type Th2, la réparation tissulaire et possèdent des propriétés immunomodulatrices. Actuellement, plusieurs études récentes remettent en cause la rigidité de cette classification et suggèrent l'existence d'une plus grande diversité fonctionnelle au sein des macrophages de type M2, notamment dans la réponse aux pathogènes *in vivo* (Martinez et Gordon, 2014).

1. Les macrophages dérivés des monocytes circulants

Provenant de la différentiation des monocytes circulants, ces macrophages se retrouvent principalement dans l'intestin (Bogunovic *et al*, 2009) et dans la zone marginale de la rate (A-Gonzalez *et al*, 2013). Les monocytes, dont ils sont issus, sont caractérisés par la présence du marqueur Ly-6C^{hi} et sont produits en permanence par la moelle osseuse (Ginhoux et Jung, 2014). Cette production s'adapte en fonction de demandes spécifiques imposées par un état particulier d'inflammation de l'organisme et la durée de demi-vie de ces monocytes circulants est d'environ 20 heures (Yona *et al*, 2013). Ainsi, dans un contexte inflammatoire, ils sont produits puis recrutés en nombre dans les zones d'inflammation notamment grâce à l'action de cytokines chemoattractantes (MCP-1 et MCP-3) sur leur récepteur CCR2 (Tsou *et al*, 2007). Une fois mobilisés, les monocytes circulants peuvent pénétrer les tissus périphériques. Pour atteindre leur destination, les monocytes circulants suivent un processus compliqué d'extravasation qui comprend des phases de capture, roulement, arrêt, adhésion, infiltration et migration transendothéliale (Shi et Pamer, 2011). Une fois arrivés sur site, ces monocytes s'accumulent et se différencient en macrophages de type M1. Ils se caractérisent alors par l'expression d'IL-12, de TNFα, de protéases, de NOS2 (Nitric Oxyde Synthase) et de CMH-II (Pittet *et al*, 2014). Cette différentiation permet aux macrophages d'acquérir leurs capacités fonctionnelles leur permettant de contrôler les pathogènes intracellulaires, digérer les tissus endommagés, activer l'immunité adaptative dans les nœuds lymphatiques et la rate mais aussi amplifier l'effet des maladies inflammatoires. Ils sont renouvelés en permanence tant que l'inflammation est présente par l'arrivée de nouveaux monocytes issus de la moelle osseuse.

2. Les macrophages résidents

La majorité des tissus contiennent des macrophages résidents. Ces populations de macrophages sont extrêmement hétérogènes, en conséquence de leurs activités très

spécialisées dans le maintien de l'homéostasie et de la fonction des tissus. Dans la classification M1/M2, on considèrera qu'ils sont majoritairement de type M2. En outre de leur fonctions régulatrices, les macrophages résidents sont aussi maintenant bien connus pour leur rôle de sentinelles immunitaires, idéalement positionnés et toujours prêts à identifier des pathogènes ou des changements pathologiques de leur environnement.

La plupart de ces macrophages possèdent une origine embryonnaire et sont dérivés de cellules du sac vitellin ou du foie fœtal (Ginhoux et Jung, 2014; Davies *et al*, 2013). Ces caractéristiques ont pu être mises en évidence chez les souris déficientes Myb KO, dont le développement des cellules souches hématopoïétiques est compromis. Ainsi, chez ces souris, on observe à l'âge adulte la présence de populations de macrophages, souvent caractérisées par une forte présence du marqueur F4/80 et dont l'origine n'est pas hématopoïétique. On retrouve ce type de macrophages dans de nombreux tissus dont la peau (cellules de Langerhans), le foie (cellules de Küpffer), le cerveau (microglie), le pancréas, les poumons, la rate (macrophages de la pulpe rouge) et les reins (Schulz *et al*, 2012). Il arrive que ces macrophages résidents n'expriment pas le marqueur F4/80 mais soient identifiables grâce à d'autres marqueurs spécifiques tels que CD169 (macrophages sous-capsulaires des nœuds lymphatiques ou macrophages métallophiles de la rate) ou Tim4 (macrophages des séreuses) (Davies *et al*, 2013). Le maintien de ces macrophages dans les tissus est permis par une capacité auto-prolifération bien que ces cellules puissent être recréées à partir de monocytes circulants sous certaines conditions très strictes encore mal connues (Hashimoto *et al*, 2013).

B. Etude du rôle des macrophages dans l'infection du virus Nipah chez la souris

Pour déterminer le rôle des macrophages dans le cadre d'une infection chez la souris, nous avons supprimé leur présence grâce à l'utilisation de liposomes contenant du clodronate. L'injection de ces liposomes conduit à leur absorption par phagocytose chez les macrophages et, une fois à l'intérieur de la cellule, le clodronate qu'ils contiennent est libéré et conduit à l'apoptose du macrophage. Cette technique largement éprouvée permet une suppression spatio-sélective puisque, selon le site d'injection choisi, les compartiments dans lesquels les macrophages vont être supprimés sont différents et bien définis (cf. Figure 24).

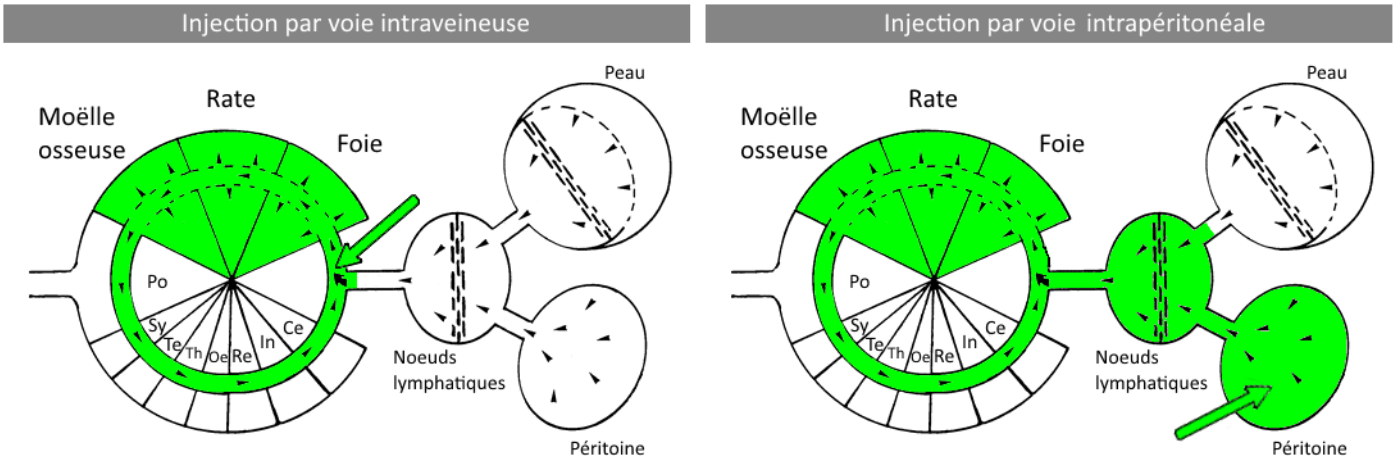


Figure 24 : Mode de distribution des liposomes de clodronate en fonction du site d'injection. D'après www.clodronateliposomes.com.

Nous avons donc infecté deux groupes de souris dont la déplétion des macrophages avait été assurée par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Le suivi de la mortalité indique que seules les souris dont la déplétion en macrophages avait été faite par voie intrapéritonéale sont sensibles à l'infection. Le seul compartiment pour lequel la déplétion est différente entre les 2 voies de déplétion est celui des nœuds lymphatiques. Il semble donc que les macrophages des nœuds lymphatiques soient particulièrement importants dans la survie des souris lors d'une infection par les Henipavirus.

Agissant aux premières étapes de l'infection, des expériences de cinétique montrent que la présence des macrophages permet de diminuer rapidement la charge virale dans différents organes, particulièrement dans la rate et le foie, et qu'en l'absence de macrophages, la charge virale se maintient.

Si l'on s'intéresse de plus près aux macrophages présents dans les nœuds lymphatiques et la rate, une sous-population bien particulière attire l'attention. Les macrophages $CD169^+$ sont une sous-population de macrophages résidents positionnés dans la zone sous-capsulaire des nœuds lymphatiques ou dans la zone marginale de la rate. Directement au contact de la lymphe, ces derniers sont les premiers à être au contact des antigènes circulants. Ils peuvent ainsi capter de façon très précoce les pathogènes circulants, les internaliser et présenter leurs antigènes de façon directe aux lymphocytes B (Junt *et al*, 2007; Phan *et al*, 2009) et dans certains cas aux lymphocytes T (Martinez-Pomares et Gordon, 2012), mais aussi de façon croisée via les cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ (Martinez-

Pomares et Gordon, 2012). Par ailleurs, ils sont capables de sécréter de grandes quantités d'IFN-β et d'IL-18 et permettent ainsi de mettre des cellules alentours dans un état antiviral ou d'activer les iLC (Barral *et al*, 2010; Gray *et al*, 2012), elles-mêmes responsables de la sécrétion d'IFN-γ nécessaire à l'activation des lymphocytes T. En plus de ces capacités, les macrophages $CD169^+$ possèdent une propriété toute particulière au sein des macrophages, celle d'exprimer la protéine Usp18. Cette protéine a pour effet de perturber la voie de signalisation de l'IFN-I en inhibant la voie de signalisation JAK/STAT (Ritchie *et al*, 2004). Ainsi, même s'il est capable de sécréter une grande quantité d'IFN-β, le macrophage $CD169^+$ est incapable d'y répondre. Plusieurs études montrent que ce comportement « suicidaire » du macrophage permet en fait la création d'un large pool d'antigènes et va favoriser la mise en place d'une réponse adaptative efficace et rapide (Honke *et al*, 2012). Une des hypothèses de travail que nous avançons est que ces macrophages sont responsables de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative chez la souris et que leur absence ne permet pas une réponse adaptative cellulaire suffisamment forte et précoce. Ils agiraient donc en chef d'orchestre, à l'interface de l'immunité innée et adaptative, pour organiser une réponse immunitaire à l'origine d'une clairance virale (Figure 25).

Pour éclaircir cette hypothèse, plusieurs travaux sont en cours. Les premiers résultats révèlent que des souris transgéniques CD169-DTR qui ne possèdent pas de macrophages $CD169^+$ sont sensibles à l'infection par le virus Nipah, confirmant le rôle prépondérant de ce type cellulaire. Par ailleurs, des études d'immunohistochimie devraient nous permettre de révéler la position exacte des cellules infectées au sein des nœuds lymphatiques ainsi que d'identifier leur nature.

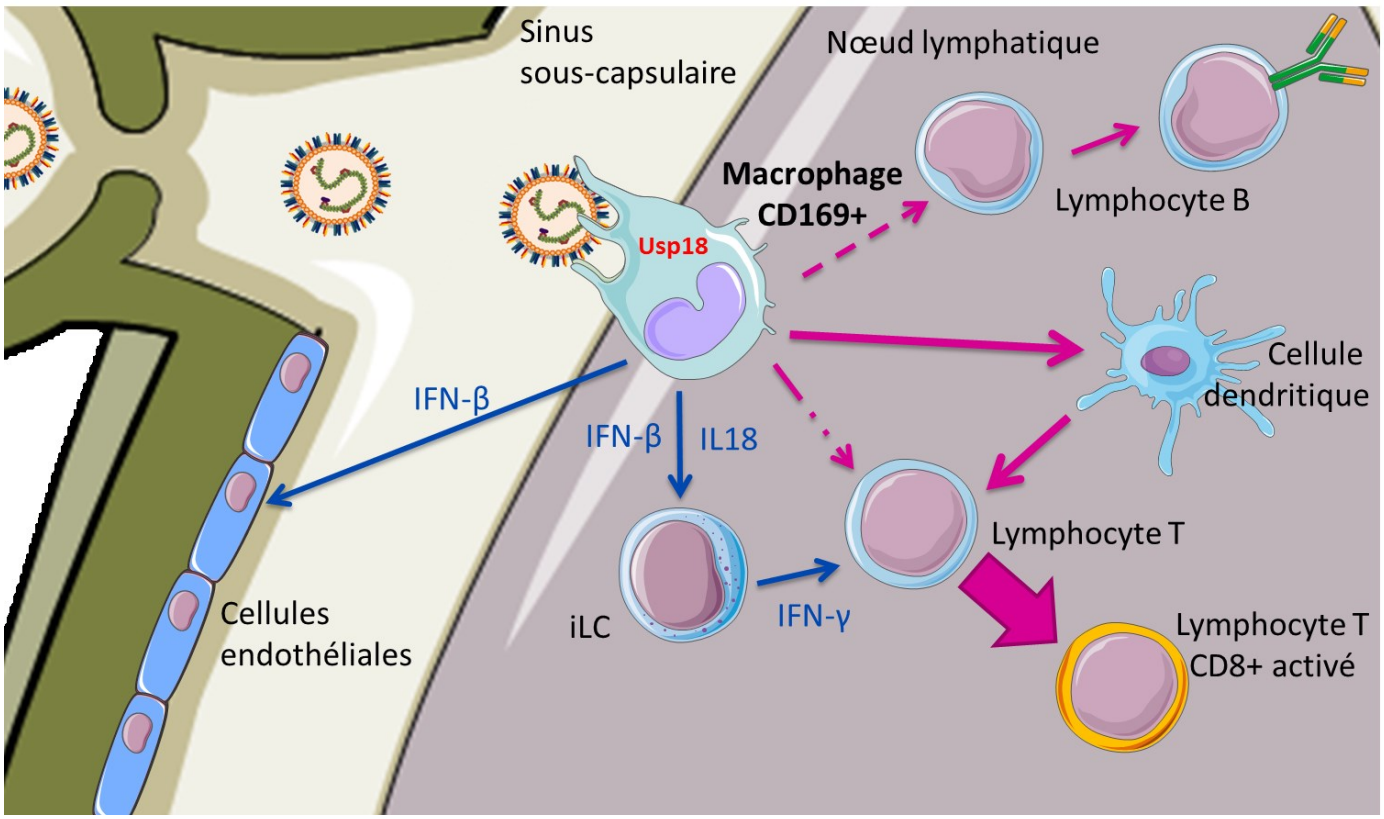


Figure 25 : Modèle d'actions des macrophages CD169^{+} lors d'une infection par le virus Nipah.

Le macrophage CD169^{+} capture le virus circulant lors de son arrivée dans le nœud lymphatique. Le virus peut se répliquer à l'intérieur du macrophage grâce à l'action inhibitrice de la protéine Usp18 sur la voie de signalisation de l'interféron. Le macrophage sécrète une grande quantité d'IFN-β ainsi que d'IL-18. Les cellules alentours sont activées (iLC) ou mises dans un état antiviral (cellules endothéliales). Le macrophage prépare et présente les antigènes du virus. La présentation des antigènes active les lymphocytes B et T. Les lymphocytes permettent d'éliminer le virus de l'organisme.

Dissection of the components of the immune response controlling highly pathogenic Nipah virus infection: macrophages as key players in the protection

Dhondt K.P.,[1-4] Duthey A.[6], Kalinke U.[7], van Rooijen N[8]., Gerlier D. [1-4], Raoul H. [6], Horvat B.[1-4]

[1] CIRI, International Center for Infectiology Research

[2] Inserm, U1111, Lyon, France

[3] CNRS, UMR5308, Lyon, France

[4] Université Lyon 1, Lyon, France

[5] Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

[6] Laboratory P4-Jean Mérieux, INSERM, 69365 Lyon, France

[7] Institute for Experimental Infection Research, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection research, Hanover, Germany

[8] Department of Molecular cell Biology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam, he Netherlands

Abstract

The Nipah virus (NiV) is a highly pathogenic zoonotic paramyxovirus of *Henipavirus* genus that causes human outbreaks annually in South-East Asia. Immunopathogenesis of this emerging virus is still poorly understood. We have analyzed the susceptibility of different type of mice, bearing defects in either innate or adaptive immune system, to NiV infection. In contrast to wild-type, mice deficient for type-I interferon (IFN-I) receptor were shown to be highly susceptible to NiV. Although elimination of viral sensing through either TLR or RLR alone was not critical in anti-viral defense, mice devoid in both TLR and RLR signaling succumbed to the infection, with similar survival rate as IFN-I deficient mice. The use of mice with tissue-specific deletion of IFN-I receptors suggested that IFN-I signaling in a single cell population, including macrophages, dendritic cells (DC), natural killer and neural cells, was dispensable in the protection from lethal NiV infection. Furthermore, the plasmacytoid DC were also shown to be nonessential in the protection. Interestingly, presence of T-cell but not B-cell compartment was critical in survival to the infection, and this effect was independent of perforin production. Finally, clodronate-induced depletion of

macrophages allowed rapid systemic propagation of NiV infection and high lethality in mice. Particularly, the presence of $CD169^{+}$ macrophages in lymph nodes was critical, suggesting their important role at the crossroads between innate and adaptive immunity, however in a USP18-independent manner. Altogether, these results revealed some novel aspects of immuno-regulation of NiV infection, which could help in development of new strategies to control this highly lethal infectious disease.

Introduction

Among the emerging viruses that came to light in the two past decades, the Nipah virus (NiV) was rapidly found of particular interest. The NiV belongs to the *Paramyxoviridae* family and forms with Hendra and Cedar viruses the *Henipavirus* genus (Marsh et al., 2012; Mayo, 2002). It is able to infect a broad spectrum of mammals including fruit bats of the *Pteropodidae* family, pigs and humans where it causes different levels of pathogenicity. Indeed, the fruit bats are an asymptomatic reservoir that contributes to the annual occurrence of the disease in Bangladesh and North India since 2001. Pigs were identified as intermediate hosts during the first outbreak in Malaysia in 1998 where a high morbidity associated with a low case fatality rate were observed (Mohd Nor et al., 2000). In humans, the infection caused by NiV induces severe respiratory and neurological signs with a case fatality rate going up to 92% (Wong and Tan, 2012). Moreover, a human-to-human transmission was demonstrated, increasing the public health concerns about this disease (Luby et al., 2009; Tan et al., 2002). There are currently neither vaccines nor therapeutics approved to cure the disease. Main health care provided to infected people consists of supportive care, hoping that the immune system will be able to cope with the virus. Even when the patients survived, the remaining neurological sequelae may still result in strong disabilities and the risk of relapse and late onset encephalitis was documented (Tan et al., 2002).

The innate immune system limits viral replication during systemic infection via the production of type I interferon (IFN-I). Lack of the receptor for IFN-I promotes viral replication and leads to viral persistence and the death of virus-infected animals (Müller et al., 1994). RNA virus infection could induce production of IFN-I via triggering of pattern recognition receptors, including Toll-like receptors (TLR) and retinoic acid-inducible gene I

(RIG-I)-like receptors (RLR) (Kawai and Akira, 2008). In addition to controlling viral replication, cells of the innate immune response initiate the priming of cells of the adaptive immune response. The role of the dendritic cells in lymphocyte priming has been well documented (Rock and Shen, 2005), and the role of macrophages in secondary lymphoid organs, such as lymph nodes and spleen, has recently become more evident (Martinez-Pomares and Gordon, 2012). Understanding the role of innate and adaptive immunity and their effect during the course of infection remains a fundamental prerequisite for effective prophylactic and therapeutic strategies. Currently, very little is known about the interactions between the NiV and the immune system. The extensive use of common and well accepted Henipavirus animal models such as golden hamster, ferret or African green monkey, which lack the numerous immunological and genomic tools that are available on human and mice, restricted this state knowledge (Dhondt and Horvat, 2013).

Despite the fact that they get infected, mice are resistant to the lethal outcome of NiV infection and do not show any clinical symptoms (Dups et al., 2014). We previously described a murine model using mice deleted for IFN-I receptor (IFNAR) and showed that type-I interferon (IFN-I) signaling is important for protection towards the lethal effects of the virus (Dhondt et al., 2013). We analyzed here a panel of established transgenic murine lines that allowed in-depth assessment of the critical arms of the innate and adaptive immune system facing NiV infection. Our results revealed the redundant role of TLR and RLR signaling platform in the protection from NiV infection. Furthermore, this study highlights the role of T lymphocytes as an indispensable effector cell population in the clearance of NiV, using perforin-independent mechanism. Finally, it underlines the role of $CD169^{+}$ macrophages at the crossroad between innate and adaptive immunity.

METHODS

Virus

NiV (isolate UMMC1, GenBank AY029767) was prepared by infecting Vero-E6 cells, in the INSERM Jean Mérieux BSL-4 laboratory in Lyon, France. Viral titration was performed as detailed previously (Mathieu et al 2012). The same batch of virus was used in all experiments.

Infection of mice

The following murine lines were used in the study:

- C57BL/6 mice (WT) (Charles River, France),
- mice deleted for type I interferon receptor (IFNAR KO) (Müller et al., 1994),
- mice with tissue–specific deletions of IFNAR in cells of neuroectodermal origin (neurons, astrocytes and oligodendrocytes) (Nes-Cre) (Detje et al., 2009), dendritic cells (CD11c-Cre) (Cervantes-Barragán et al., 2009), macrophages and granulocytes (LysM-Cre) (Clausen et al., 1999) and Natural Killer cells (NK-Cre) (Mizutani et al., 2012),
- mice deleted for RLR adaptor protein (MAVS KO) (Sun et al., 2006), TLR adaptor protein (MyD88 KO) (Kawai et al., 1999), TLR3 receptor (TLR3 KO) (Alexopoulou et al., 2001),
- mice deleted for MAVS and MyD88 (Spanier et al., 2014),
- mice devoid of lymphocytes and innate lymphoid cells (RAG2 γc KO) (Traggiai et al., 2004), lymphocytes only (RAG2 KO) (Shinkai et al., 1992), B cells only (μMT KO) (Phillips et al., 1996) or T cells only (CD3ε KO) (Malissen et al., 1995),
- mice deleted for perforin involved in immune cell cytotoxicity (Perforin KO) (Kägi et al., 1994),
- mice deleted for C-C chemokine receptor type 2 involved in monocyte chemotaxis (CCR2 KO) (Boring et al., 1997),
- mice deleted for Usp18 protein involved in disturbance of IFN-I signaling (Usp18 KO) (Ritchie et al., 2002),
- mice in which injection of diphtheria toxin induced specific depletion of plasmacytoid DC (BDCA2-DTR, Jackson) (Swiecki et al., 2010) and $CD169^{+}$ macrophages (CD169-DTR, Ricken) (Miyake et al., 2007).

Groups of 5–6 mice of each strain (PBES, ENS-Lyon, France), 4–6 weeks old were anesthetized with isoflurane and infected intraperitoneally with 10^6 plaque forming units (pfu) of virus in 0.2 mL or with equivalent volume of DMEM (mock). Surviving animals were followed between 28 and 34 days after inoculation. All animals were handled in strict

accordance with good animal practice and experiments were approved by Regional Ethical Committee CECCAPP.

Depletion of cell populations

Depletion of cell populations was induced by different means. In DTR mice, depletion was induced by intraperitoneal injection of diphtheria toxin (Sigma) at the dose of 30µg/kg. The mice were injected at days (D) D-2, D3, D7, D13 and D17. Depletion of NK cells was induced by intraperitoneal injection of anti-NK1.1 antibodies at the dose of 4mg/kg. The mice were injected at days D-2, D0 and D5. Depletion of macrophages was induced by intraperitoneal injection of clodronate liposomes at the dose of 80µg/kg at days D-7 and D-2 or intravenous injection at the dose of 40µg/kg at day D-2. The control groups were treated as above with liposomes encapsulating PBS (PBS Lipo). Clodronate were obtained from clodronateliposome.org (Vrije Universiteit, Amsterdam, the Netherlands) (Van Rooijen and Sanders, 1994).

Histology and Immunohistochemistry (IHC)

Histology and IHC were performed as described elsewhere (Dhondt et al., 2013). For conventional histology, slides were colored Hematoxylin, Phloxin B and Saffrone. Colored slides were dehydrated through graded alcohols and xylene. Sections were mounted with DPX mounting medium and cover-slipped. For IHC study a primary rabbit anti-NiV N purified antibody (ValBex, France) was applied diluted at 1:10000 in PBS with 2.5% of decomplemented horse serum overnight at 4°C. Further steps were performed following manufacturer's recommendations of ImmPress/ImmPACT system (Vector Lab., USA).

Slides were analyzed with Zeiss AxioImager Z1 microscope equipped with Metamorph software.

RT-qPCR

RNA extraction, RT-PCR and qPCR were performed as described elsewhere (Dhondt et al., 2013). Briefly, RNA was extracted from organs using RLT buffer (Qiagen) and Nucleospin RNA kit (Macherey-Nagel). RT-PCR was performed with iScript cDNA kit (BioScript). qPCR was performed with Power SYBR Master mix (Life Technologies) on StepOne plus instrument (Applied Biosystems) with StepOne software. Calculations were

made using the $2^{\Delta\Delta CT}$ model, according to the MIQE guideline and normalized by the standard deviation of the average GAPDH expression.

Statistical analysis

Data were expressed as mean and standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using Mann-Whitney U-test, Two-way Anova test and Mantel-Cox Chi2 test (survival).

RESULTS

TLR and RLR viral detection systems have redundant role in sensing NiV infection

As we previously demonstrated the critical role of IFN-I signaling in the protection of mice form the lethal NiV infection (Dhondt et al., 2013), we analyzed here the mechanism of the IFN-I induction, by focusing to the role of TLR and RLR. We compared the susceptibility of mice bearing specific deletions in either RLR (MAVS KO) or TLR (MyD88 KO and TLR3 KO) signaling platforms or in both of them (double MyD88/MAVS KO mice) to NiV infection. Following intraperitoneal infection of 10^6 pfu of NiV, mice were monitored daily during 28 days for clinical signs and mortality. The MAVS KO, MyD88 KO and TLR3 KO mice did show any clinical signs during the study. However, when we infected double MyD88/MAVS KO, we observed the survival phenotype similar to what was seen in IFNAR KO mice (Figure 1A) and mice presented severe neurological syndrome and clinical signs as previously reported for IFNAR KO mice (Dhondt et al., 2013). While IFNAR KO mice succumbed to NiV infection at day 6, MyD88/MAVS KO mice died between day 9 and 17, although difference was not statistically significant.

IFN-I-induced protection does not require single specialized cell type

The plasmacytoid DC (pDC) are known as major IFN-I producer cells. The depletion of pDC in BDCA2-DTR mice was induced by i.p. injection of diphtheria toxin and mice were inoculated with 10^6 pfu i.p. of NiV, however, clinical signs and mortality were not observed during the course of the study (Figure 1B), suggesting that pDC do not present the critical cell population responsible for the IFN-I production during NiV infection in mice.

To determine the cell population which could be critical for the response to IFN-I signaling, we analyzed mice with conditional deletion of IFN-I receptor (IFNAR) in different cell types for their susceptibility to NiV infection. We tested mice lacking IFNAR specifically in neural cells (Nes Cre/IFNAR flox), DCs (CD11c Cre/IFNAR flox) or NK cells (NK Cre/IFNAR flox). However, following infection with 10^6 pfu i.p. of NiV, none of these lineages showed any clinical signs during the study (Figure 1B). These results suggest that although IFN-I signaling is necessary for survival, it is not criticaly linked to any of single cell types analyzed in the study.

Role of lymphocytes in NiV clearance in mice

We observed that if IFNAR KO mice survive during the 12 days post-infection, they will resolve the infection and clear the virus, suggesting thus the involvement of the acquired immunity, activated later during the infection. To better understand the role of adaptive immune system, which becomes fully protective several days after virus entry, we next investigated the role of cellular and humoral immunity, using several KO models. Thus, mice lacking both B and T lymphocytes and innate lymphoid cells (RAG γc KO), mice lacking T and B lymphocytes (RAG2 KO), or lacking either T (CD3ε KO) or B lymphocytes (μMT KO), as well as mice depleted for NK cells by injection of anti-NK1.1 antibodies, were inoculated with 10^6 pfu i.p. of NiV and monitored daily for clinical signs and mortality (Figure 2A). Mortality was recorded in RAGγc KO between day 8 and 20 (Figure 2B) but not in NK1.1 depleted mice, suggesting that lymphocytes and innate lymphoid cells are critical for survival but NK activity was dispensable. Delayed mortality was recorded between day 14 and 27 (Figure 2B) in RAG2 KO mice, confirming the critical role of lymphocytes for the final viral clearance. Surprisingly, comparison of mortality of μMT KO and CD3ε KO revealed that only CD3ε KO mice were susceptible to NiV infection (between day 17 and 31 (Figure 2B)), suggesting the critical role of T lymphocytes rather than B cells. Interestingly, T cell activity in anti-viral response does not seem to depend cytotoxic activity of perforin, as preforirn deficient mice were resistant to infection (Figure 2A) Statistical analysis of mortality periods revealed 3 independent periods of mortality, the first related to IFNAR KO, the second related to RAG2 γc KO, and the third related to RAG2 KO and CD3ε KO mice (Figure 2B), suggesting the successive activation of different cell populations, involved in anti-NiV defense.

Spread of NiV infection within infected mice

Virus propagation in different organs was monitored by quantification of the nucleoprotein (NiV N) RNA by RT-qPCR (Figure 2C). The N expression was found in almost all analyzed organs with no specific organ-related or mouse strain-related pattern. These results were confirmed at the protein level by immunohistochemistry (Figure 3). Viral nucleoprotein was found in brain (A, B, C), lungs (D, E, F), spleen (G, H, I) and lymph nodes (J, K, L), from IFNAR KO (J, K), RAG2 KO (A, B, D, E and G), RAG2 γc KO (C, F) and CD3ε KO (H, I, L) mice. In brain, positive staining was found in neurons. In lungs, positive staining was observed in endothelial cells, smooth muscle cells and pneumocytes. In spleen and lymph nodes, positive staining was mainly found in lymphatic and vascular endothelial cells although strong staining of subcapsular region in these organs suggested that splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus macrophages may be infected as well.

Depletion of macrophages highly increases susceptibility of mice to NiV infection

As macrophages present the key cell population implicated in the IFN-I mediated control of viral infection (Aichele et al., 2003; Cervantes-Barragán et al., 2009; Honke et al., 2012), we further analyzed the role of this population during the course of NiV infection. We used clodronate liposomes injected either i.v. to induce the depletion of macrophages from bone marrow, spleen and liver or i.p. to induce the depletion of macrophages in previously described compartments and additionally in mesenteric lymph nodes (Van Rooijen and Sanders, 1994). Once depletion was performed, mice were injected with 10^6 pfu i.p. of NiV and monitored daily for clinical signs and mortality. Control mice, which received liposomes containing PBS, all survived to the infection, one animal (20%) of i.v. depleted animals succumbed at day 18 and five animals (80%) of i.p. depleted animals succumbed between day 4 and 15 (Figure 4A). These results strongly suggested the critical role of mesenteric lymph node macrophages in the protection of mice from lethal NiV i.p. infection.

To monitor the spreading of the virus in macrophages-depleted mice and control mice, we analyzed a kinetic of infection in spleen and liver. The presence of the virus was followed by RT-qPCR based on the detection of the nucleoprotein RNA of NiV. Results show that the viral load is higher in macrophage-depleted mice and whereas the viral charge decreases rapidly after day 2 in spleen and day 4 in liver for mock treated animal, the viral

charge decreases slowly and tends to maintain in macrophage depleted animals (Figure 4B). Thus, macrophages are responsible for reducing viral load in the early steps of infection.

CD169^{+} macrophages play a critical protective role during NiV infection

Metallophilic macrophages in the marginal zone of the spleen and subcapsular sinus of lymph nodes, characterized by the expression of C-type lectin CD169 (siglec-1), have been suggested to play an important role in the anti-viral response and activation of acquired immunity (Martinez-Pomares and Gordon, 2012). To assess their role during NiV infection, we used CD169-DTR mice where depletion of CD169 macrophages can be induce by injection of diphtheria toxin. Once injected i.p. with 10^{6} pfu of NiV, mice were monitored daily during 34 days and clinical signs and mortality was recorded. Three of seven animals died between day 9 and day 18 (Figure 4C). Comparison with animals depleted with clodronate liposomes i.p. showed similar mortality pattern, but reduced mortality. As previous studies demonstrated the critical role of Usp18 protein in CD169^{+} macrophages (Honke et al., 2012), we infected Usp18 KO mice with NiV. Unlike to what was observed for vesicular stomatitis virus (VSV), Usp18 deletion did not affect survival of infected mice. To analyze the implication of the other macrophage populations and particularly those recruited from monocytes to the peritoneal cavity, after i.p. infection, we infected CCR2 KO mice, lacking the CCR2 receptor, involved in the monocyte chemotaxis. Neither clinical signs nor mortality was observed suggesting that the role of this macrophage population was dispensable in the protection. Finally, to test whether interferon signaling is critical in macrophages, we used the conditional IFNAR KO mice, deficient for IFNAR only in macrophages and granulocytes (LysM Cre/IFNAR flox). However, infection of these mice did not reveal any critical role of type-I IFN signaling in these cell populations either (Figure 4C). Quantification of NiV N RNA in tissues by RT-qPCR revealed that viral RNA was observed at varying levels in brain, liver, lungs and spleen. Surprisingly, the level of NiV N RNA in brains of clodronate liposome depleted mice was below quantification level. Altogether, these results suggest that macrophages play an important role in protection of mice against NiV infection and CD169$^{+,}$ probably with the help of other macrophage populations, are implicated and act in USP18-independent manner.

Discussion

The type of immune response capable to efficiently contain lethal NiV infection is still largely unknown. We addressed here this question using a large panel of mice deficient for different components of the innate and adaptive immune systems. As our previous work demonstrated the essential role of IFN-I signaling in the control of NiV infection (Dhondt et al., 2013), we analyzed in this study the nature of intracellular sensor of viral infection, critical for the induction of IFN-I response. Although individual signaling pathways through RLR, analyzed by MAVS deficient mice, or through TLR, analyzed using MyD88 and TLR3 deficient mice, were independently sufficient for protection, mice deleted for both RLR and TLR (MyD88/MAVS deficient mice) succumbed to the NiV infection in a similar way to mice deficient for IFN-I receptor. These results suggest the redundant role for RLR and TLR in the sensing of NiV infection and indicate that TLR and RLR signaling are independently involved in the efficient protection against lethal NiV infection in mice. Similar results were obtained recently for other RNA viruses, including VSV (Spanier et al., 2014) or rotavirus (Broquet et al., 2011). However, in some other viral infections, including human metapneumovirus or sendai virus either RLR or TLR signaling was shown to be necessary to induce an efficient anti-viral protection (Baños-Lara et al., 2013; Gitlin et al., 2010).

Although pDC, specialized in IFN-I production, are considered to play critical role in anti-viral defense (Gilliet et al., 2008), their depletion in mice did to increase the susceptibility to NiV infection, suggesting the importance of the other cell types in the production of IFN-I. Similarly, in the response to Newcastle disease virus, the major source of IFN-I were not pDCs but alveolar macrophages (Kumagai et al., 2007). Several mouse models enable addressing the biological role of different immune cell subsets in virus recognition and their capacity to raise protective IFN-I response. Surprisingly, in contrast to the other infectious models, IFN-I signaling in either macrophages, DCs, NK cells or in neural cells was not crucial for the protection from lethal NiV infection. It may be possible that activity of two different cell populations is redundant and that ablation of two or more of them is needed to abolish protection in mice. This has been very recently shown to be the case for Dengue virus, where IFN-I signals in both macrophages and DCs were implicated in the control of the infection (Züst et al., 2014).

Interestingly, our results demonstrated that T lymphocytes, rather then B cells, were critical for the protection. In human cases, NiV infection induced production of virus-specific antibodies in the serum and cerebrospinal fluid of infected patients. However, no difference was observed in clinical features, laboratory results or mortality between seropositive and seronegative patients (Goh et al., 2000; Luby et al., 2006). T cell responses have not been analyzed in humans so far. Recent indirect results, showing the efficient vaccination protection in the absence of detectable humoral response, suggest the induction of protective T cell response following the vaccination with recombinant AAV vector, expressing NiV G protein (Ploquin et al., 2013). The anti-viral activity of T lymphocytes does not seem to involve cytotoxicity, as our results demonstrated a complete protection in perforin-deficient mice. The action of T cells may involve viral clearance via IFN gamma production, as shown for some other neurotropic viral infections including measles (Patterson et al., 2003), and remains to be analyzed for NiV infection. Determination of the T cell arm of the immune system as protective against NiV infection is particularly important in the context of design of future Henipavirus vaccines and these results suggest that testing of T cell response should be added in protocols aiming to study the efficiency of vaccination.

Macrophages are known to play an important role in host anti-viral defense by bridging the innate and adaptive immune systems (Martinez-Pomares and Gordon, 2012). Indeed, our results demonstrated that clodronate-induced depletion of macrophages renders mice highly susceptible to NiV infection. As intraperitoneal injection of clodronate depletes macrophages in lymph nodes in addition to other organs which are affected after intravenous injection of clodronate (Van Rooijen and Sanders, 1994) we postulate that lymph node macrophages play a critical role in anti-NiV defense. Several populations of macrophages have been described in lymph nodes, with potentially different functions (Kastenmüller et al., 2012). Our results suggest that $CD169^+$ macrophages are involved in the anti-NiV protection, although they do not seem to be the only population of macrophages with that function in mice, demonstrated with the 50% of survival of mice depleted for this population. Recent data suggest also that $CD169^+$ macrophages activate $CD8^+$ T cells by transferring the antigen to DCs in the spleen (Backer et al., 2010) or by directly crosspresenting antigen to $CD8^+$ T cells (Asano et al., 2011; Chtanova et al., 2009) although this mechanism may not be ubiquitous, especially in lungs (Purnama et al., 2014). Recently, a mechanism of enforced viral replication was demonstrated, enabling particular

subpopulation of CD169^{+} macrophages to support productive early viral infection, leading to the efficient innate and adaptive immune activation (Honke et al., 2012, 2013). Interestingly, in contrast to what was demonstrated with VSV (Honke et al., 2012), the expression of ubiquitin-specific protease Usp18, responsible for lifting the protective IFN-I shield selectively in CD169^{+} macrophages, was not critical in the protection from NiV infection. Identification of the other macrophage populations and their specific role in the protection against NiV, as well as the mode of protection induced by CD169^{+} macrophages remains to be elucidated.

Results obtained with different transgenic models suggested that establishment of a protective immune response to NiV infection may take place in three different waves (Figure 5). Early after infection virus is sensed by RLR/TLR signaling platform leading to the production of IFN-I and consecutive protection (Figure 5A). In the absence of this initial response, mortality takes place early after infection. In the second stage, the implication of both innate and adaptive immunity takes place, as analyzed with the model of RAG γc KO mice, lacking T and B lymphocytes as well as innate lymphoid cells that are dependent on the expression of γc chain of the cytokine receptor. Survival time observed in macrophage-depleted mice corresponds to that group as well (Figure 5 B). Finally, the third wave, taking place three weeks after infection, involves adaptive immune system and establishment of an efficient T cell response (Figure 5C). Therefore, both innate and adaptive arms of the immune system seem to play a critical and non-redundant role in the protection to NiV infection, and seemed to be interconnected by macrophage activity. Deficiency in either of them results in the death of infected animals.

Although henipaviruses provoke serious diseases in their spillover hosts, they seem to be asymptomatic in their natural hosts, Pteropus fruit bats. The interactions between NiV and bat innate immunity are far from being understood. Although IFN-I signaling was shown to play a critical role in protecting mice from Henipavirus infection (Dhondt et al., 2013) both IFN-I and IFN type III were inhibited by HeV and NiV in bat cells, suggesting that bats control henipavirus infection by yet unidentified mechanism (Lo et al., 2010). Recently, a new Henipavirus was reported in rats, in China (Wu et al., 2014), expanding the natural hosts for these enigmatic viruses to another species different from bats. Results obtained in mice in this study do not necessarily correspond to neither human nor bat response, but do allow

obtaining the first insights in the components of the anti-NiV response *in vivo* and provide the exciting challenges for the future research. Understanding the host-pathogen relationship in different species and immunopathogenesis of NiV infection is essential for further identification of cellular and molecular targets for prophylactic and therapeutic intervention.

Acknowledgments

The work was supported by INSERM, ANR-09-MIEN-018-01, ANR-ASTRID-2011 and KD was supported by DGA and INSERM. We thank to A. Vallve, L. Barrot, A. Duthey and other biosafety team members from INSERM BSL4 “Jean Mérieux” for their assistance and members of the group Immunobiology of viral infection, CIRI, Lyon, for the help in the achievement of this study. We also thank our collaborators of CIRI for providing murine transgenic lines, especially Drs. Thierry Defrance, Laurent Genestier, Marie-Cécile Michallet, Thomas Henry and Thierry Walzer, Dr Karl Lang (Essen University, Germany) and members of PBES-ENS-Lyon for taking care of mice, especially Jean-Louis Thoumas, Marie Teixera, Nadine Aguilera, David Gallouche and Céline Angleraux.

References

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., and Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. J. Immunol. *171*, 1148–1155.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-κB by Toll-like receptor 3. Nature *413*, 732–738.

Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.-H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., and Tanaka, M. (2011). CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. Immunity *34*, 85–95.

Backer, R., Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jüngerkes, F., Tüting, T., Boon, L., O'Toole, T., Kraal, G., Limmer, A., et al. (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 216–221.

Baños-Lara, M.D.R., Ghosh, A., and Guerrero-Plata, A. (2013). Critical role of MDA5 in the interferon response induced by human metapneumovirus infection in dendritic cells and in vivo. J. Virol. *87*, 1242–1251.

Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V., Broxmeyer, H.E., and Charo, I.F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. J. Clin. Invest. *100*, 2552–2561.

Broquet, A.H., Hirata, Y., McAllister, C.S., and Kagnoff, M.F. (2011). RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 1618–1626.

Cervantes-Barragán, L., Kalinke, U., Züst, R., König, M., Reizis, B., López-Macías, C., Thiel, V., and Ludewig, B. (2009). Type I IFN-Mediated Protection of Macrophages and Dendritic Cells Secures Control of Murine Coronavirus Infection. J. Immunol. *182*, 1099–1106.

Chtanova, T., Han, S.-J., Schaeffer, M., van Dooren, G.G., Herzmark, P., Striepen, B., and Robey, E.A. (2009). Dynamics of T cell, antigen-presenting cell, and pathogen interactions during recall responses in the lymph node. Immunity *31*, 342–355.

Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. Transgenic Res. *8*, 265–277.

Detje, C.N., Meyer, T., Schmidt, H., Kreuz, D., Rose, J.K., Bechmann, I., Prinz, M., and Kalinke, U. (2009). Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. J. Immunol. *182*, 2297–2304.

Dhondt, K.P., and Horvat, B. (2013). Henipavirus Infections: Lessons from Animal Models. Pathogens *2*, 264–287.

Dhondt, K.P., Mathieu, C., Chalons, M., Reynaud, J.M., Vallve, A., Raoul, H., and Horvat, B. (2013). Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection. J. Infect. Dis. *207*, 142–151.

Dups, J., Middleton, D., Long, F., Arkinstall, R., Marsh, G.A., and Wang, L.-F. (2014). Subclinical infection without encephalitis in mice following intranasal exposure to Nipah virus-Malaysia and Nipah virus-Bangladesh. Virol. J. *11*, 102.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.-J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat. Rev. Immunol. *8*, 594–606.

Gitlin, L., Benoit, L., Song, C., Cella, M., Gilfillan, S., Holtzman, M.J., and Colonna, M. (2010). Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo. PLoS Pathog. *6*, e1000734.

Goh, K.J., Tan, C.T., Chew, N.K., Tan, P.S., Kamarulzaman, A., Sarji, S.A., Wong, K.T., Abdullah, B.J., Chua, K.B., and Lam, S.K. (2000). Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. N. Engl. J. Med. *342*, 1229–1235.

Honke, N., Shaabani, N., Cadeddu, G., Sorg, U.R., Zhang, D.-E., Trilling, M., Klingel, K., Sauter, M., Kandolf, R., Gailus, N., et al. (2012). Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. Nat. Immunol. *13*, 51–57.

Honke, N., Shaabani, N., Zhang, D.-E., Iliakis, G., Xu, H.C., Häussinger, D., Recher, M., Löhning, M., Lang, P.A., and Lang, K.S. (2013). Usp18 driven enforced viral replication in dendritic cells contributes to break of immunological tolerance in autoimmune diabetes. PLoS Pathog. *9*, e1003650.

Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., Podack, E.R., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature *369*, 31–37.

Kastenmüller, W., Torabi-Parizi, P., Subramanian, N., Lämmermann, T., and Germain, R.N. (2012). A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. Cell *150*, 1235–1248.

Kawai, T., and Akira, S. (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1143*, 1–20.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity *11*, 115–122.

Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. (2007). Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. Immunity *27*, 240–252.

Lo, M.K., Miller, D., Aljofan, M., Mungall, B.A., Rollin, P.E., Bellini, W.J., and Rota, P.A. (2010). Characterization of the antiviral and inflammatory responses against Nipah virus in endothelial cells and neurons. Virology *404*, 78–88.

Luby, S.P., Rahman, M., Hossain, M.J., Blum, L.S., Husain, M.M., Gurley, E., Khan, R., Ahmed, B.N., Rahman, S., Nahar, N., et al. (2006). Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. Emerg. Infect. Dis. *12*, 1888–1894.

Luby, S.P., Gurley, E.S., and Hossain, M.J. (2009). Transmission of human infection with Nipah Virus. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *49*, 1743–1748.

Malissen, M., Gillet, A., Ardouin, L., Bouvier, G., Trucy, J., Ferrier, P., Vivier, E., and Malissen, B. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. EMBO J. *14*, 4641–4653.

Marsh, G.A., de Jong, C., Barr, J.A., Tachedjian, M., Smith, C., Middleton, D., Yu, M., Todd, S., Foord, A.J., Haring, V., et al. (2012). Cedar Virus: A Novel Henipavirus Isolated from Australian Bats. PLoS Pathog. *8*, e1002836.

Martinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2012). CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. Trends Immunol. *33*, 66–70.

Mayo, M.A. (2002). Virus taxonomy - Houston 2002. Arch. Virol. *147*, 1071–1076.

Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., and Tanaka, M. (2007). Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. J. Clin. Invest. *117*, 2268–2278.

Mizutani, T., Neugebauer, N., Putz, E.M., Moritz, N., Simma, O., Zebedin-Brandl, E., Gotthardt, D., Warsch, W., Eckelhart, E., Kantner, H.-P., et al. (2012). Conditional IFNAR1 ablation reveals distinct requirements of Type I IFN signaling for NK cell maturation and tumor surveillance. Oncoimmunology *1*, 1027–1037.

Mohd Nor, M.N., Gan, C.H., and Ong, B.L. (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot. *19*, 160–165.

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M., and Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. Science *264*, 1918–1921.

Patterson, C.E., Daley, J.K., Echols, L.A., Lane, T.E., and Rall, G.F. (2003). Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. J Immunol *171*, 3102–3109.

Phillips, J.A., Romball, C.G., Hobbs, M.V., Ernst, D.N., Shultz, L., and Weigle, W.O. (1996). CD4+ T cell activation and tolerance induction in B cell knockout mice. J. Exp. Med. *183*, 1339–1344.

Ploquin, A., Szécsi, J., Mathieu, C., Guillaume, V., Barateau, V., Ong, K.C., Wong, K.T., Cosset, F.-L., Horvat, B., and Salvetti, A. (2013). Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines. J. Infect. Dis. *207*, 469–478.

Purnama, C., Ng, S.L., Tetlak, P., Setiagani, Y.A., Kandasamy, M., Baalasubramanian, S., Karjalainen, K., and Ruedl, C. (2014). Transient ablation of alveolar macrophages leads to massive pathology of influenza infection without affecting cellular adaptive immunity. Eur. J. Immunol. *44*, 2003–2012.

Ritchie, K.J., Malakhov, M.P., Hetherington, C.J., Zhou, L., Little, M.-T., Malakhova, O.A., Sipe, J.C., Orkin, S.H., and Zhang, D.-E. (2002). Dysregulation of protein modification by ISG15 results in brain cell injury. Genes Dev. *16*, 2207–2212.

Rock, K.L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. Immunol. Rev. *207*, 166–183.

Van Rooijen, N., and Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. J. Immunol. Methods *174*, 83–93.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell *68*, 855–867.

Spanier, J., Lienenklaus, S., Paijo, J., Kessler, A., Borst, K., Heindorf, S., Baker, D.P., Kröger, A., Weiss, S., Detje, C.N., et al. (2014). Concomitant TLR/RLH Signaling of Radioresistant and Radiosensitive Cells Is Essential for Protection against Vesicular Stomatitis Virus Infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 3045–3054.

Sun, Q., Sun, L., Liu, H.-H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., and Chen, Z.J. (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. Immunity *24*, 633–642.

Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y., and Colonna, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. Immunity *33*, 955–966.

Tan, C.T., Goh, K.J., Wong, K.T., Sarji, S.A., Chua, K.B., Chew, N.K., Murugasu, P., Loh, Y.L., Chong, H.T., Tan, K.S., et al. (2002). Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. Ann. Neurol. *51*, 703–708.

Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. Science *304*, 104–107.

Wong, K.T., and Tan, C.T. (2012). Clinical and Pathological Manifestations of Human Henipavirus Infection. Curr. Top. Microbiol. Immunol.

Wu, Z., Yang, L., Yang, F., Ren, X., Jiang, J., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Zhou, H., and Jin, Q. (2014). Novel Henipa-like Virus, Mojiang Paramyxovirus, in Rats, China, 2012. Emerg. Infect. Dis. *20*.

Züst, R., Toh, Y.-X., Valdés, I., Cerny, D., Heinrich, J., Hermida, L., Marcos, E., Guillén, G., Kalinke, U., Shi, P.-Y., et al. (2014). Type I interferon signals in macrophages and dendritic cells control dengue virus infection: implications for a new mouse model to test dengue vaccines. J. Virol. *88*, 7276–7285.

Figure Legends:

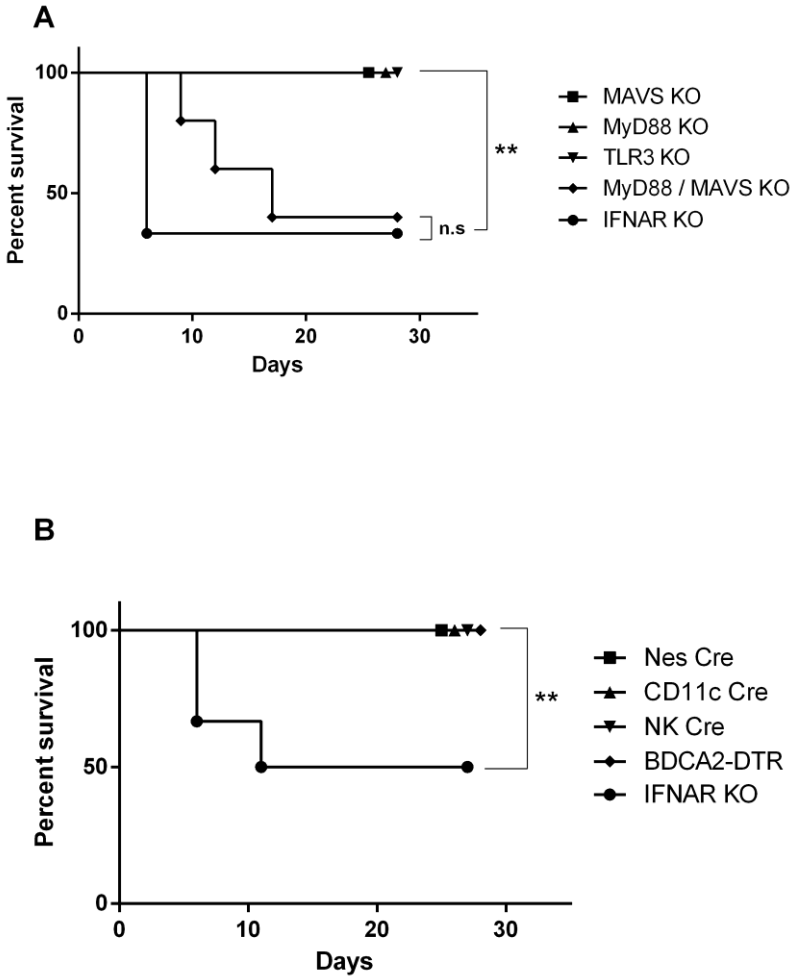


Figure 1. Role of the different components of innate immune system in the survival of mice following NiV infection. (A) NiV infection in mice deficient for TLR and RLR receptors. MyD88 KO, TLR3 KO, MAVS KO, MyD88/MAVS KO, and IFNAR KO mice (5-6 weeks old) were infected intraperitoneally (i.p.) with 10^6 pfu of NiV and followed during 4 weeks post infection. Significant mortality was observed in IFNAR KO mice and MyD88/MAVS KO mice. Statistical analysis: n.s. not significant, ** $p < 0.01$ (B) IFN-I protective effect seems not to require single specialized cell type. Mice with tissue specific IFN-I receptor deletions in neural cells (Nes-Cre/IFNAR flox), DCs (CD11c Cre/IFNAR flox) and NK clls (NK Cre/IFNAR flox), or with systemic deletion: IFNAR KO mice, and BDCA2-DTR mice depleted in pDC, were infected i.p. with 10^6pfu of NiV and observed during 4 weeks. Only IFNAR KO mice presented significant mortality. Statistical analysis: ** $p < 0.01$

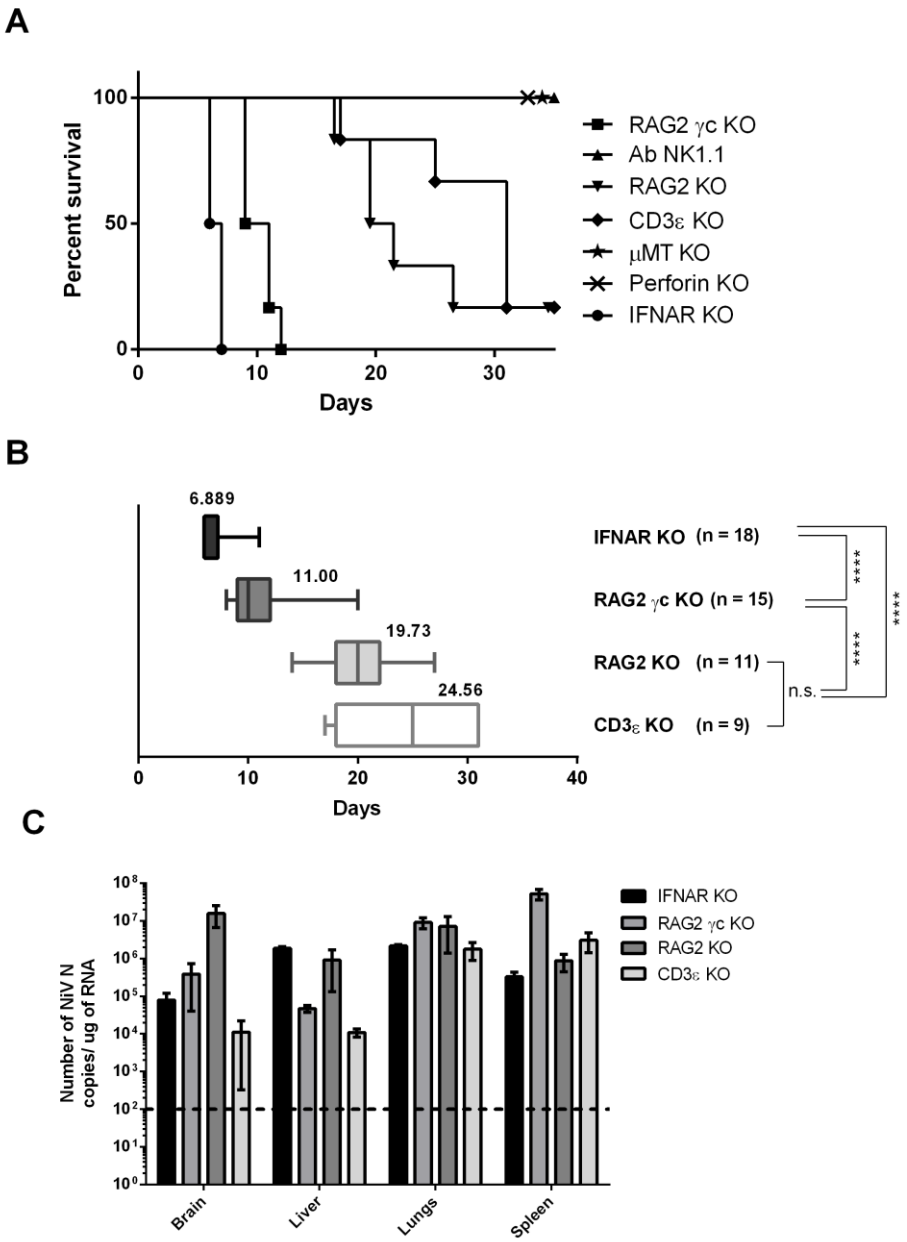


Figure 2. T lymphocytes are mandatory for NiV clearance in mice. (A) IFNAR KO, RAG2 γc KO, RAG2 KO, CD3ε KO, µMT KO and Perforin KO mice and mice treated with Ab NK1.1, were infected i.p. with 10^6pfu of NiV and observed during 4 weeks. (B) Box plot representation of the mean survival time of deceased animals in susceptible murine lines. Statistical analysis: Mann-Whitney test, n.s. not significant, **** $p<0.0001$; (C) Quantification of NiV N copies/µg of tissues in different organs from moribund IFNAR KO, RAG2 γc KO, RAG2 KO and CD3ε KO mice. The virus was found in high titer in all organs showing the systemic distribution of the virus in all susceptible models. Dashed line represent quantification limit.

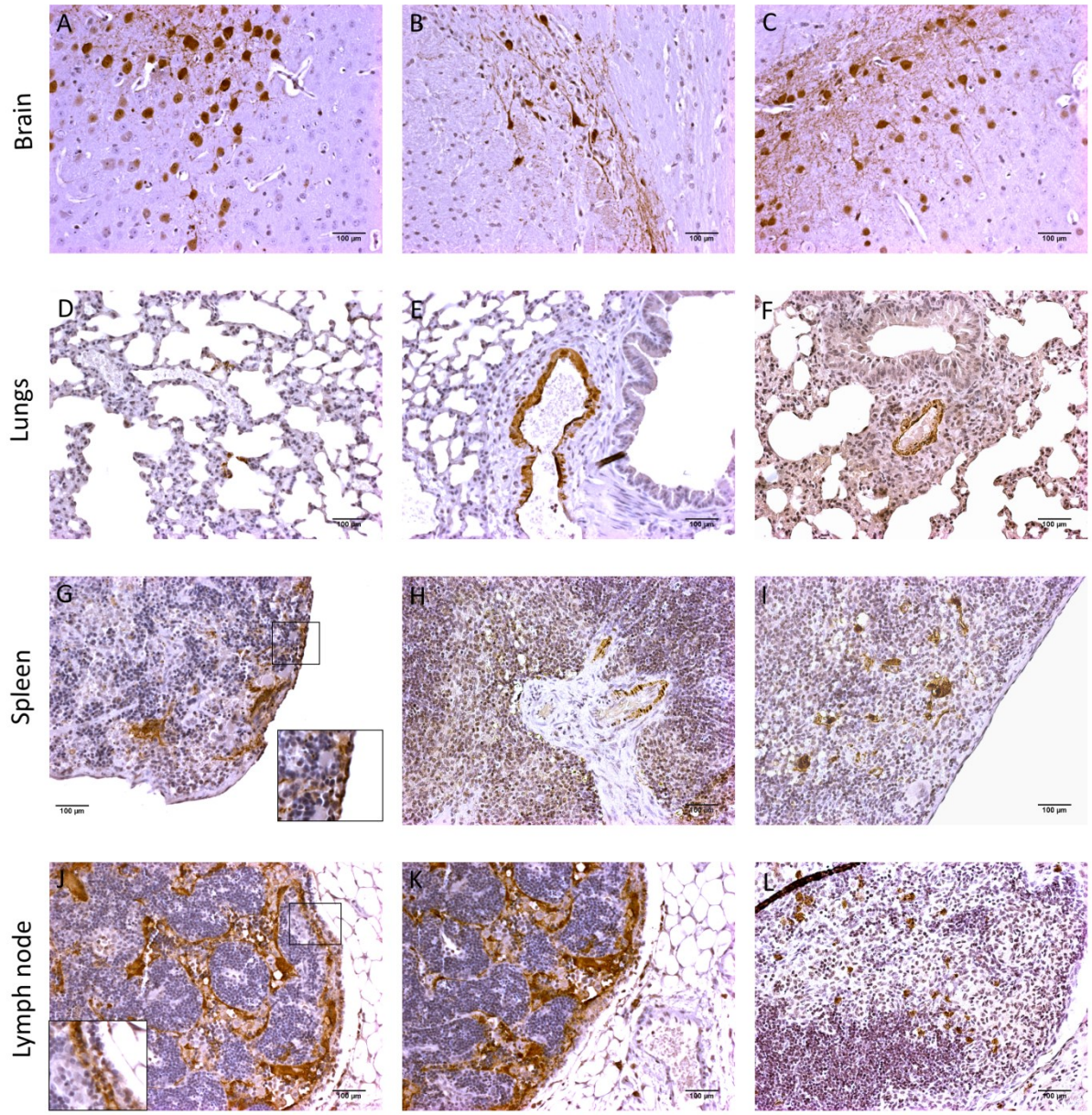


Figure 3. Immunohistochemistry of NiV N expression in infected mice. Brain (A, B, C) lungs (D, E, F), spleen (G, H, I), lymph nodes (J, K, L) were analyzed from IFNAR KO (J, K), RAG2 KO (A, B, D, E and G), RAG2 γc KO (C, F) and CD3ε KO (H, I, L) mice. Organs were taken from euthanized moribund mice. Staining of NiV N protein appears in brown and counterstaining by hematoxylin in purple. G, J enlarged sections of marginal zone and subcapsular sinus are presented.

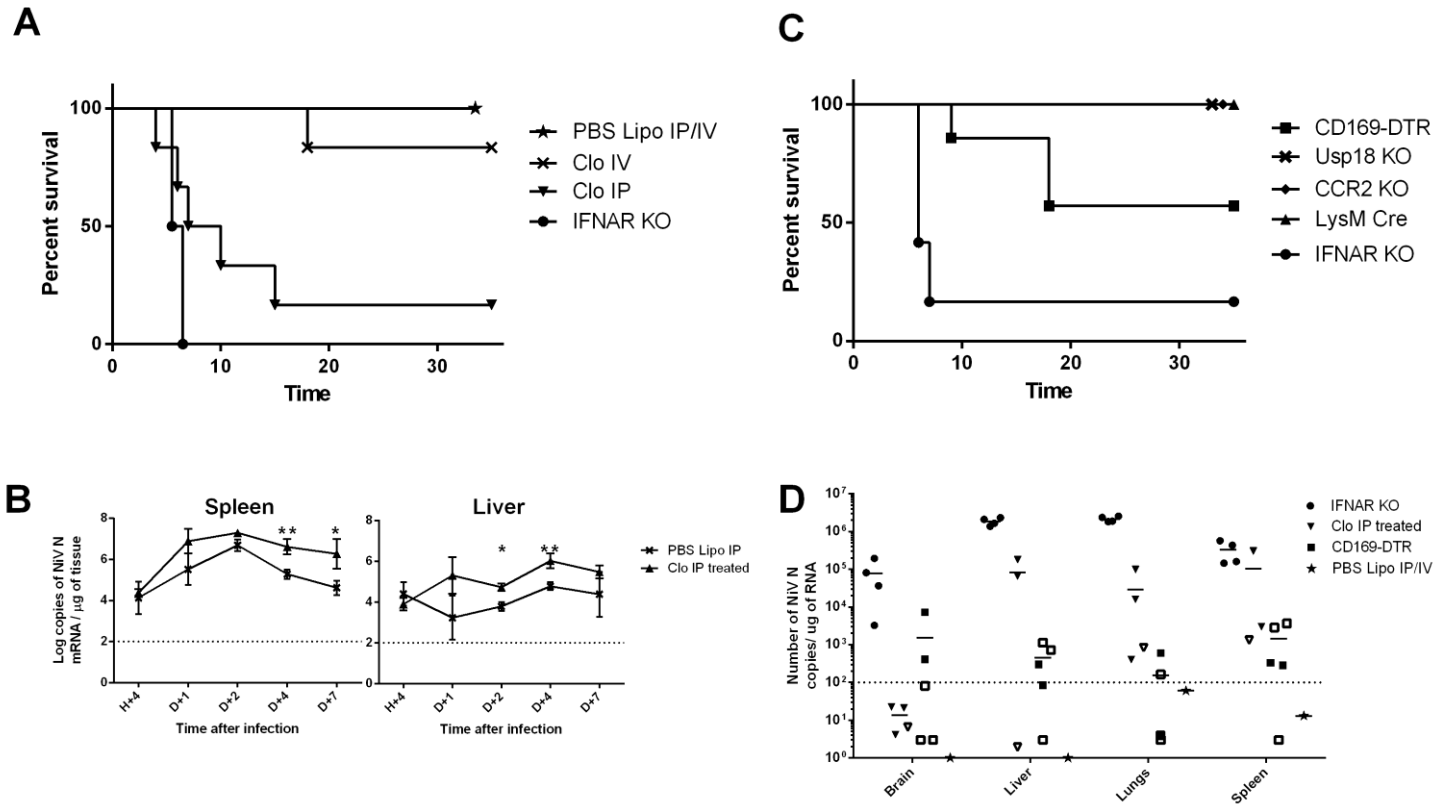


Figure 4. Depletion of macrophages highly increases susceptibility of mice to NiV infection. (A) Wild Type C57Bl/6 (WT) mice treated with PBS liposomes injected i.p. and i.v. (PBS Lipo IP/IV), WT mice treated with clodronate liposomes injected i.p. (Clo IP), or i.v. (Clo IV), were infected i.p. with 10^6pfu of NiV and observed during 4 weeks. (B) WT mice treated either with clodronate liposomes or PBS liposomes i.p. were infected i.p. with 10^6pfu of NiV. Groups of 3 mice from each group were sacrificed at 4h, 1, 2, 4 and 7 days post-infection and the presence of virus was quantified by RT-qPCR based on the NiV N RNA in spleen and liver. (C) IFNAR KO mice, LysM-Cre/IFNAR flox mice, CCR2 KO mice, CD169-DTR mice depleted for $CD169^+$ macrophages (n=7) and Usp18 KO (n=4) mice were infected i.p. with 10^6pfu of NiV and observed during 4 weeks. (D) Quantification of NiV N copies/µg of tissues in different organs, obtained from either moribund or mice at the end of the experimental protocol (one month post infection): IFNAR KO, Clo IP, CD169-DTR and PBS IP/IV mice. Empty symbols represent surviving animals. Dashed line represent quantification limit.

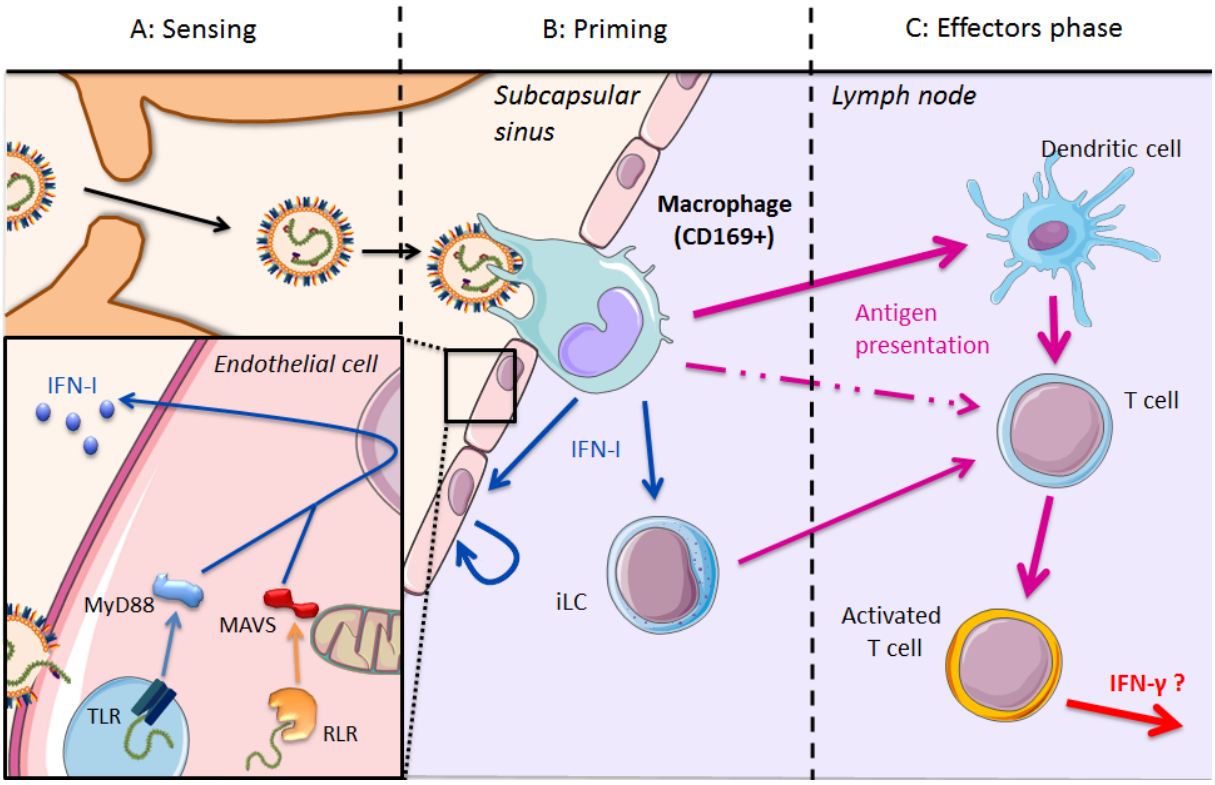


Figure 5. Schematic presentation of the possible role of immune system in the protection of mice from NiV infection. NiV entry into mice is followed by development of immune response going through 3 distinct phases. (A) Initial viral replication in susceptible cells, including endothelial cells, is detected by the TLR and RLR signaling platform, leading to the production of the first wave of IFN-I (blue arrows). (B) Interaction of the virus with lymph node macrophages induces the activation of the immune system and results in priming of anti-viral effector cells. Innate lymphoid cells (iLC) and DCs may additionally amplify the response. (C) Generation of adaptive T cell immune response leads to the final virus clearance in mice.

Partie V. Perturbation des voies de signalisation de l'immunité innée par les protéines virales non structurales

I. Rôle des protéines non structurales virales dans l'évasion de la réponse immunitaire

Comme vu précédemment au chapitre Partie I. I. C. 2. b, les protéines non structurales des Henipavirus sont connues pour interférer dans les voies de signalisation de l'immunité innée et fournir au virus un échappement à la réponse immunitaire qui en découle.

A. Perturbation de la voie des RLR et TLR

Les RLR et TLR permettent la reconnaissance d'un très grand nombre d'éléments associés à la présence de pathogènes (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns) et sont alors en mesure de déclencher une réponse visant à éliminer la menace. Ainsi, de nombreux virus, dont les Henipavirus, ont développé des stratégies visant à perturber le fonctionnement de ces détecteurs.

Le domaine C-terminal de la protéine V des Henipavirus est capable de se fixer sur le domaine hélicase de MDA5, entrainant l'abolition de l'activité ATPase de celle-ci et donc la reconnaissance de l'ARN double brin viral (Childs *et al*, 2007a; Childs *et al*, 2009). La protéine LGP2 n'a pas d'action directe sur la production d'interféron car elle est dépourvue des domaines CARD qui permettent l'interaction avec MAVS, la protéine adaptatrice permettant la poursuite de la signalisation. En revanche, elle agit en tant que régulateur de RIG-I et MDA5 et, c'est en ce sens, que son inhibition par la protéine V du virus Nipah, qui se fixe sur son site d'interaction, perturbe le fonctionnement d'une réponse adaptée (Childs *et al*, 2012). Dans les faits, il semblerait que la protéine V du virus Nipah stabiliserait l'interaction entre LGP2 et RIG-I au niveau du site de reconnaissance de cette dernière et, ainsi, empêcherait la réversibilité du rétrocontrôle négatif exercé par LGP2.

La signalisation des TLR et RLR converge vers une voie commune, contrôlée notamment par les protéines IRF3, IRF7 et IKKα. L'inhibition de ces effecteurs communs

représente pour le virus une voie d'inhibition à moindre coût et de plus grande efficacité. La protéine W du virus Nipah est capable d'agir sur ce point par un mécanisme tout à fait original. En effet, cette protéine est dotée d'un signal de localisation nucléaire (NLS) qui lui permet d'être recrutée dans le noyau de la cellule. D'ici, elle est capable d'intercepter le complexe phosphorylé d'IRF-3 / IRF-7 avant sa fixation sur le promoteur du gène de l'IFN-β (Shaw *et al*, 2005). L'effet de la protéine V des Henipavirus sur IRF-3 ne semble pas significatif. Il s'agirait manifestement d'une question de compartimentation cellulaire car une protéine V mutée pour se localiser dans le noyau possède une activité similaire à celle de W et, à l'inverse, une protéine W mutée pour se localiser dans le cytoplasme ne possède plus d'activité significative sur la voie IRF-3 (Shaw *et al*, 2005). Ceci peut s'expliquer par la présence de nombreuses kinases fonctionnelles dans le cytoplasme qui pourraient contrebalancer les effets de ces protéines virales. Enfin, la protéine C du virus Nipah est aussi capable d'inhiber les voies de signalisation des TLR par des mécanismes encore assez mal connus (Mathieu, Guillaume, Volchkova, *et al*, 2012b). De nouveaux éléments de réponse tendent à montrer que la protéine C interagirait avec IKKα et, en empêchant la phosphrylation d'IRF-7, inhiberait la production d'IFN-α (Yamaguchi *et al*, 2014). La protéine IKKα intervient aussi sous la voie des RLR où elle permet la translocation de NF-κB dans le noyau mais le rôle de la protéine C des Henipavirus sur cette voie n'a encore jamais été démontré.

B. Perturbation de la voie de l'interféron de type I

En aval des voies de détection des pathogènes et en l'absence d'inhibition de celles-ci, la cellule met en place une première réponse basée sur la synthèse d'interférons, molécules qui vont lui permettre ainsi qu'à ses voisines, de synthétiser de nouvelles protéines lui permettant de se mettre dans un état peu favorable au développement d'un pathogène (ralentissement de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle, dégradation accrue du contenu cellulaire, …). Ainsi, lorsque l'interféron libéré dans le milieu extracellulaire par la cellule infectée est détecté par une cellule avoisinante saine, l'activation du récepteur IFNAR provoque l'activation d'une voie d'activation conduite par les protéines STAT-1 et STAT-2 jusqu'à l'activation des gènes effecteurs (Interferon Stimulated Genes).

Les protéines P, V et W partagent le même domaine N-terminal et donc partagent aussi les mêmes propriétés vis-à-vis des dimères STAT-1 / STAT-2. En effet, c'est ce domaine qui permet aux protéines virales de se fixer à STAT-1 pour en empêcher la phosphorylation (Lo *et al*, 2012). Mais cette action sur la voie de signalisation de l'interféron est complétée, de façon tout à fait originale et spécifique des Henipavirus, par un autre mécanisme. En effet, contrairement à la protéine V du virus parainfluenza humain de type 2, du virus des oreillons et du virus Sendaï qui inactivent les dimères STAT en les détournant vers le protéasome où ils sont détruits (Eaton *et al*, 2006), les protéines P et V du virus Nipah ne conduisent pas à la destruction des dimères mais à leur séquestration en complexes de haut poids moléculaire, parfaitement inefficaces (Shaw *et al*, 2004). Bien qu'incapable d'influer sur la phosphorylation des STAT, la protéine W est aussi capable de séquestrer les dimères dans le noyau (Ciancanelli *et al*, 2009). Ce mécanisme inédit permet un deuxième niveau de blocage pour compléter l'action des protéines P et V mais agit aussi de façon plus durable en empêchant le recyclage des STAT vers le cytoplasme.

II. Article en cours de préparation : Perturbation de la voie de signalisation NF-κB par les protéines virales non structurales

Kévin P. Dhondt*[1-5], François Enchéry*[1-5], Chloé Journo[1-5], Louis-Marie Bloyet[1-5], Renaud Mahieux[1-5], Denis Gerlier[1-5], Branka Horvat[1-5]

*contributions égales

[1] CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie

[2] Inserm, U1111, Lyon, France

[3] CNRS, UMR5308, Lyon, France

[4] Université Lyon 1, Lyon, France

[5] Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

A. Introduction

NF-κB est une famille de facteurs de transcription dont la translocation nucléaire est déclenchée par de nombreuses voies de signalisation (RLRs, TLRs, IL-1R (Interleukine-1 Receptors), TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), …). Cette famille de protéine permet la production de cytokines pro-inflammatoires via le complexe des protéines IKKs (I-kappa-B-

kinase) (IKKα, IKKβ et IKKγ (ou NEMO (NF-kappa-B Essential Modulator)) dans la voie canonique et via la protéine IKKα dans la voie non canonique, et est de ce fait le principal régulateur de la réponse inflammatoire (Oeckinghaus *et al*, 2011) (Figure 26). Les voies de signalisation de NF-κB sont souvent la cible de protéines virales, notamment des protéines non structurales des paramyxovirus. Par exemple, la transfection de la protéine V (ainsi que des protéines P et C) du virus de la rougeole perturbe la translocation de certaines sous-unités de NF-κB (Schuhmann *et al*, 2011). Ces propriétés des protéines non structurales du virus de la rougeole permettraient un contrôle de l'activation de NF-κB plus propice à la dissémination du virus (Vijayan *et al*, 2014). En outre, la protéine C du virus Nipah interagit avec la protéine IKKα (également impliquée dans la phosphorylation d'IRF7 et la production d'IFNα) (Yamaguchi *et al*, 2014). Malgré tout, il existe peu de données sur le contrôle des voies de signalisation de NF-κB par les protéines non structurales du virus Nipah.

Au vu des résultats déjà publiés dans notre équipe (Mathieu, Guillaume, Volchkova, *et al*, 2012a) et de l'importance que semblent revêtir les voies de NF-κB chez l'hôte réservoir asymptomatique du virus Nipah (Zhang *et al*, 2013), **nous proposons dans cette partie d'analyser les rôles éventuels des protéines non structurales du virus Nipah dans le contrôle du déclenchement des voies de signalisation de NF-κB.**

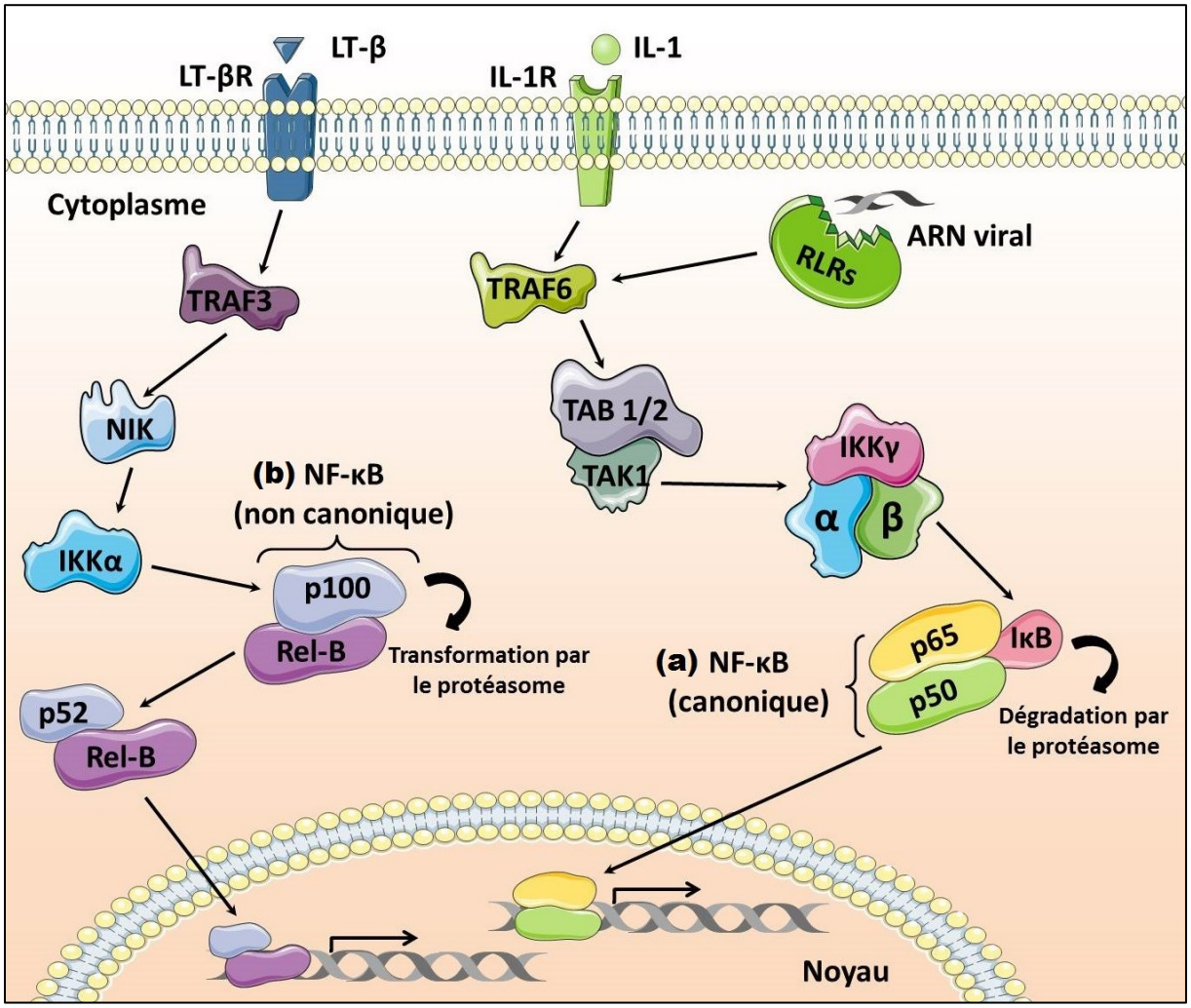


Figure 26 : Représentation simplifiée des voies canonique et non canonique de NF-κB.

(a) *Dans la voie canonique, l'IL-1R et les RLRs activent le complexe des protéines IKKs (IKKα, IKKβ et IKKγ) via TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6), TAB1 et 2 (TAK1-Binding 1 et 2) et TAK1 (TGFβ Activated Kinase 1). Le complexe des protéines IKKs permet la phosphorylation d'I-κB (Inhibitor-kappa B), son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Le dimère NF-κB (ici p65/p50) n'est alors plus séquestré dans le cytoplasme et est transloqué vers le noyau. D'autres récepteurs, sont impliqués dans le déclenchement de la voie canonique via d'autres adaptateurs protéiques (TNFR, TLRs, TCR (T Cell Receptor), …).* ***(b)*** *Dans la voie non canonique, le LT-βR (Lymphotoxin-β receptor) entraîne l'activation de la protéine IKKα par la protéine NIK (NF-kappa-B Inducing Kinase) via TRAF3 (TNF Receptor Associated Factor 3), ce qui permet la phosphorylation de la sous-unité p100, son ubiquitination et sa transformation par le protéasome. Le dimère NF-κB (p52/RelB) n'est alors plus séquestré dans le cytoplasme et est transloqué vers le noyau. D'autres récepteurs, sont impliqués dans le déclenchement de la voie non canonique (BCR (B Cell Receptor), BAFFR (B cell-Activating Factor Receptor), …).* ***(a et b)*** *Les facteurs de transcription, ainsi transloqués dans le noyau, se fixent à toute une gamme de promoteurs permettant l'activation de nombreux gènes, dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires.*

B. Matériel et méthode

1. Lignées cellulaires

Les cellules Human Embryonic Kidney 293T (HEK-293T) et Human Embryonic Kidney 293 (exprimant constitutivement un gène rapporteur luciférase Firefly, sous le contrôle du promoteur ELAM (Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule)) (HEK-293-pr(ELAM).luc) ont été cultivées et maintenues dans du Dulbecco's Medium Eagle's Modified (DMEM Gibco, Invitrogen), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco), 2 mM de L-Glutamine, 10 mM de tampon HEPES et 40 µg/mL de gentamycine, à 37°C sous 5% de CO2 et 95% d'humidité.

2. Constructions plasmidiques

Les différentes séquences codant pour les protéines P, V, W et C du virus Nipah Malaisie (numéro d'accession AF376747.1) ont été obtenues par RT-PCR random primers + oligo dT (SuperScript® II Reverse Transcriptase d'Invitrogen) à partir de l'ARN extrait de cellules HEK-293 infectées par le virus Nipah et amplifiées par PCR (PrimeSTAR® HS DNA Polymerase de Takara). Les séquences codant pour les protéines de la famille des IKKs (IKKα, IKKβ et IKKγ) de l'Homme ont été obtenues par PCR à partir des plasmides d'expression glu1-IKKα, glu1-IKKβ et glu1-IKKγ gracieusement donnés par l'équipe de Vincent Lotteau (CIRI, Lyon, France). Ces séquences ont été purifiées sur gel d'agarose (kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification de GE Healthcare), puis insérées par recombinaison homologue avec la polymérase du virus de la vaccine (kit Infusion® de Clontech) dans différents vecteurs.

Pour les PCA (Protein Complementation Assay) basés sur la luciférase *Gaussia princeps*, les plasmides, déjà disponibles dans notre équipe, glu1-HA-pCi, glu2-Flag-pCi, pCi-HA-glu1 et pCi-Flag-glu2 (codant pour le premier ou le second domaine de la luciférase *Gaussia princeps*) permettent l'ajout des éléments protéiques glu1-HA ou glu2-Flag aux extrémités N-terminales ou C-terminales des protéines à tester. La liaison entre la protéine d'intérêt et l'élément glu est assurée par la charnière flexible de 23 résidus d'acides aminés (GGGGSGGGGSPITSLYKKVGGRS) décrite par Cassonet et al. en 2011. Ces plasmides ont été préalablement digérés et purifiés sur gel d'agarose pour l'insertion des séquences nucléiques des protéines à tester.

Pour les tests fonctionnels, les plasmides pCG-HA et pCG-Flag ont été construits à partir d'un plasmide pCG déjà disponible dans notre équipe. Les séquences nucléiques sens et antisens correspondant aux étiquettes HA et Flag ont été synthétisées par la société Eurofins Genomics. L'hybridation des brins sens et antisens s'est faite dans un tampon adéquat par diminution progressive de la température après une dénaturation à 98°C. Les séquences d'ADN double brin ainsi obtenues ont été insérées par recombinaison homologue (kit Infusion® de Clontech) dans le plasmide pCG préalablement digéré et purifié sur gel d'agarose. Une fois digérés et purifiés sur gel d'agarose, ces plasmides pCG-HA et pCG-Flag permettent l'ajout des étiquettes HA ou Flag aux extrémités N-terminales des protéines à tester.

Après recombinaison homologue, les plasmides contenant les différentes séquences nucléiques des protéines du virus Nipah et des protéines de la famille des IKKs ont été produits par transformation de bactéries compétentes *E.coli* Stellar (Clontech). Les plasmides issus de colonies séparées et purifiés (kit NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel) ont été sélectionnés par criblage après digestion par une enzyme de restriction (choisie pour donner une carte de restriction différente du plasmide vide d'origine et un profil de migration typique correspondant à la séquence insérée) et migration sur gel d'agarose.

Le plasmide pCAGGS-NiVC-Flag, codant pour la protéine C du virus Nipah Malaisie étiquetée Flag en partie C-terminale, nous a gracieusement été donné par l'équipe de Christopher F. Basler (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA). Le plasmide d'expression pCG-MeVN était déjà disponible dans notre équipe et a été construit selon les mêmes méthodes que celles décrites ci-dessus.

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage et leur expression par Western-Blot.

3. Analyse par Western-Blot

Des cellules HEK-293T ont été ensemencées à 6.10^5 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Après 24h, les cellules ont été transfectées avec du JetPrime (Polyplus-Transfection®) avec 2 µg de plasmide. 24h post-transfection, les cellules ont été décrochées des puits par l'utilisation de trypsine, centrifugées, lavées avec du tampon phosphate salin

(PBS) et re-centrifugées. Le culot cellulaire a ensuite été lysé dans 50 µl dans un tampon de lyse (6 M d'urée, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH8, 0,6% NP40, 2 mM EDTA et 1X de Complete ® (Roche)). Les lysats ont été incubés 20 minutes à 4°C, puis centrifugés 10 minutes à 15000 g à 4°C. Les surnageants ont été récupérés et les protéines dénaturées par ajout de tampon de Laemmli (1X final). Les polypeptides ont été séparés par SDS-PAGE sur gels à 10% (protéines < 80 kDa) ou 12% (protéines > 90 kDa) de polyacrylamide et transférés sur une membrane de polyvinylidene difluorife (PVDF, GE Healthcare) pendant une nuit à 4°C à 50 mA dans du tampon de transfert (CAPS 1X et éthanol 10 %). Les membranes ont été rincées dans du tampon TBS-Tween 1X (50 mM Tris, 150 mM NaCl et 0.05% Tween 20) et saturées dans du TBS-Tween 1X-lait 5% pendant 1 heure à température ambiante avant d'être incubées avec les anticorps primaires (de souris ou de lapin) dilués dans du TBS-Tween 1X-lait 5% pendant 2h à température ambiante, sous agitation. Les membranes ont ensuite été lavées 7 fois (2 lavages rapides + 5 lavages de 5 minutes) avec du TBS-Tween 1X avant d'être incubées pendant 1h sous agitation à température ambiante avec les anticorps secondaires (anticorps anti-souris ou anti-lapin) dilués dans du TBS-Tween 1X-lait 1%. Une série de 7 lavages a été faite avant la révélation (kit de luminescence Covalight® de Covalab).

4. Virus et test fonctionnel avec gène rapporteur Luciférase en contexte d'infection

Des cellules HEK-293-pr(ELAM).luc ont été ensemencées à 2.10^4 cellules (dans 100 µl) par puits dans des plaques 96 puits (traitées avec de la Poly-D-Lysine à 50 µg/ml). 24h après ensemencement, les cellules ont été infectées avec le virus Nipah Malaisie (isolat UMMC1 ; GenBank AY029767) ou le virus Nipah recombinant C-KO (Mathieu, Guillaume, Volchkova, *et al*, 2012a) à une MOI de 1. 24h après infection, les cellules ont été traitées avec 20 ng/ml d'IL-1β (selon la légende). Après 6h d'incubation, les cellules ont été lysées dans 40 µl de tampon de lyse du kit Luciferase Assay system® (Promega) pendant 30 minutes sous agitation. L'activité de la luciférase Firefly a été mesurée par un luminomètre (Tecan M1000pro Infinite®) après ajout de 80 µl de substrat de la luciférase Firefly (Promega) et exprimée en RLU (Relative Luminescence Unit).

5. Test fonctionnel avec gène rapporteur Luciférase en contexte de transfection

Des cellules HEK-293-pr(ELAM).luc ont été ensemencées à 2.10^4 cellules (dans 100 µl) par puits dans des plaques 96 puits (traitées avec de la Poly-D-Lysine à 50 µg/ml). Après 24h, des triplicats de cellules ont été transfectés avec du JetPrime (Polyplus-Transfection®) avec un des plasmides codant pour les protéines P, V, W et C du virus Nipah, et pour la nucléoprotéine du virus de la Rougeole (MeV) à différentes concentrations (50 ng, 100 ng et 200 ng) et 20 ng d'un plasmide pHRL-tk exprimant la luciférase Renilla pour la normalisation du signal. Dans chaque puits, la concentration totale de plasmides a été ajustée en ajoutant le vecteur vide correspondant à celui codant pour la protéine virale (pCG pour les protéines P, V, W, et N de MeV, et pCAGGS pour la protéine C). 24h après transfection, des triplicats ont été traités avec 20 ng/ml d'interleukine-1 β (IL-1β) (selon la légende). Après 6h de traitement, 25 µl de milieu ont été retirés dans chaque puits (pour ajuster la concentration avec le réactif selon le protocole Dual-Glo® Luciferase Assay System de Promega), avant une incubation de 10 minutes à température ambiante. Une lecture de la luminescence sans ajout de réactif a été réalisée par un luminomètre (Berthold® Mithras LB940) pour déterminer le bruit de fond. 75 µl de substrat Dual-Glo® Luciferase (Promega) ont été ajoutés dans chaque puits et, après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'activité de la luciférase Firefly a été mesurée par le luminomètre. 75 µl de substrat Stop&Glo® (Promega) ont été ajoutés dans chaque puits et, après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'activité de la luciférase Renilla *Gaussia princeps* a été mesurée avec le luminomètre. Les mesures obtenues (exprimées en RLU) ont été traitées comme suit : activité de la luciférase dépendante du promoteur ELAM = (RLU Firefly – RLU blanc) / (RLU Renilla).

6. Test de complémentation protéique basé sur la luciférase (Figure 3)

Des cellules HEK-293T ont été ensemencées à 2.10^4 cellules (dans 100 µl) par puits dans des plaques 96 puits (traitées avec de la Poly-D-Lysine à 50 µg/ml). Après 24h, des triplicats de cellules ont été transfectés avec du JetPrime (Polyplus-Transfection®) avec deux plasmides différents (100 ng chacun), codant respectivement pour une protéine A étiquetée glu1 (en partie N ou C-terminale) et pour une protéine B étiquetée glu2 (en partie N ou C-terminale). Les cellules ont été lysées 24h post-transfection dans 40 µl de tampon de lyse

Renilla 1X (Promega) pendant 30 minutes sous agitation. L'activité de la luciférase de *Gaussia princeps* a été mesurée par un luminomètre (Berthold® Mithras LB940) après ajout de 80 µl de substrat de Luciférase Renilla (Promega) et exprimée en RLU (Relative Luminescence Unit). Chaque activité luciférase a été calculée à partir de la moyenne de trois essais et exprimée en rapport de luminescence normalisé (NLR, Normalized Luminescence Ratio) calculé comme suit : pour le couple protéique testé A et B, la luminescence mesurée pour des cellules co-exprimant les protéines glu1-A + glu2-B a été divisée par la somme du signal RLU mesuré de chaque partenaire co-exprimé avec le plasmide vide correspondant (glu1-A + glu2-B) / [(glu1-A + glu2) + (glu1 + glu2-B)] (Figure 27. A). Le NLR mesuré reflète l'interaction entre le couple protéique testé. Une interaction est considérée comme positive lorsque le NLR est supérieur à 3,5 avec un intervalle de confiance de 97,5% (Cassonnet *et al*, 2011). Les NLR obtenus pour les différentes combinaisons de protéines (sous-unités glu1 et glu2 en partie N ou C-terminales) ont été normalisés à l'aide de l'interaction entre la protéine P du virus Nipah et sa nucléoprotéine, afin de faciliter la comparaison avec les résultats de la Figure 30.

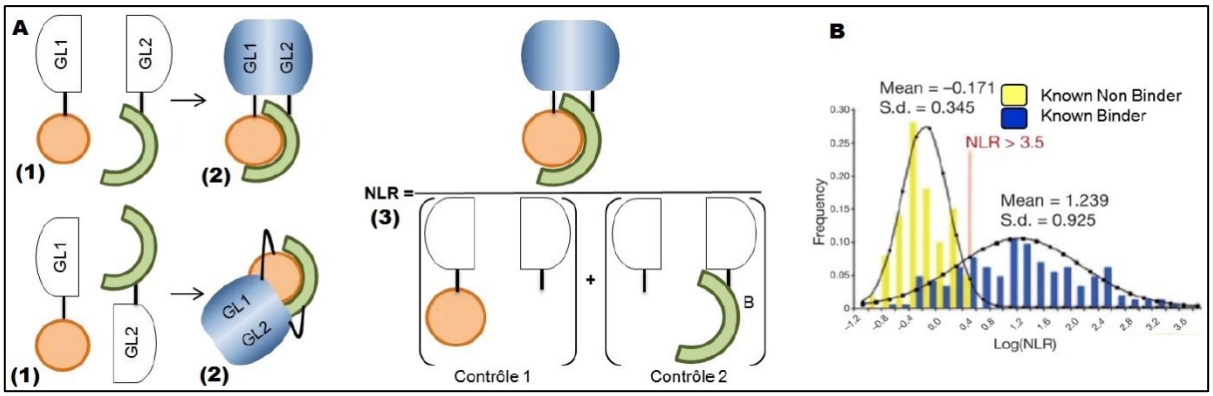


Figure 27 : HT-GPCA (High-Throughput Gaussia princeps Luciferase-Based Complementation Assay), test de complémentation protéique basé sur la luciférase Gaussia princeps.

Deux partenaires protéiques potentiels sont fusionnés respectivement avec le domaine gl1 ou gl2 de la luciférase en position N ou C-terminale (A1). Le rapprochement des deux sous-unités de la luciférase, consécutive à une interaction protéique, permet la restauration de l'activité enzymatique quantifiable de la luciférase (A2). Cette méthode qualitative présente l'avantage de pouvoir se dérouler dans une cellule de mammifère, contexte cellulaire plus pertinent que la levure. Les données sont exprimées en rapport de luminescence normalisée (Normalized Luminescence Ratio, NLR) (A3) avec comme valeur seuil NLR >3,5 (B) (Cassonnet et al*, 2011).*

7. Analyses statistiques

Les résultats présentés sont les moyennes des valeurs obtenues dans les différentes expériences, accompagnées de l'écart-type. Les analyses statistiques réalisées dans le cadre des tests fonctionnels en contexte d'infection et de transfection sont des tests t non appariés avec correction de Welch, en supposant la normalité des populations. Les résultats significatifs sont représentés par * pour $0.01 < p < 0.05$, ** pour $0.001 < p < 0.01$, *** pour $0.0001 < p < 0.001$ et **** pour $p < 0.0001$.

C. Résultats préliminaires

1. Effet de l'infection par le virus Nipah sur les voies de signalisation de NF-κB

Afin d'analyser l'effet de l'infection du virus Nipah sur l'activation des voies de NF-κB, nous avons utilisé des cellules HEK-293-pr(ELAM).luc (Figure 28). Le promoteur ELAM possède trois sites de fixation des dimères de NF-κB (Jensen et Whitehead, 2003) et ne permet pas de faire la distinction entre l'activation des voies canonique et non canonique. De plus, le promoteur ELAM n'est pas spécifique des voies de NF-κB, en effet il possède un site de fixation AP1 (Jensen et Whitehead, 2003).

Dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc infectées par le virus Nipah, l'activité du gène rapporteur est significativement supérieure par rapport à celle des cellules non infectées ($p = 0,0075$) (Figure 28. A). Cependant, lors de l'infection par le virus recombinant C-KO, l'activité du gène rapporteur est inférieure par rapport à celle des cellules infectées par le virus Nipah ($p = 0,0094$) et également diminuée par rapport à l'activité du promoteur dans les cellules non infectées ($p = 0,0332$) (Figure 28. A).

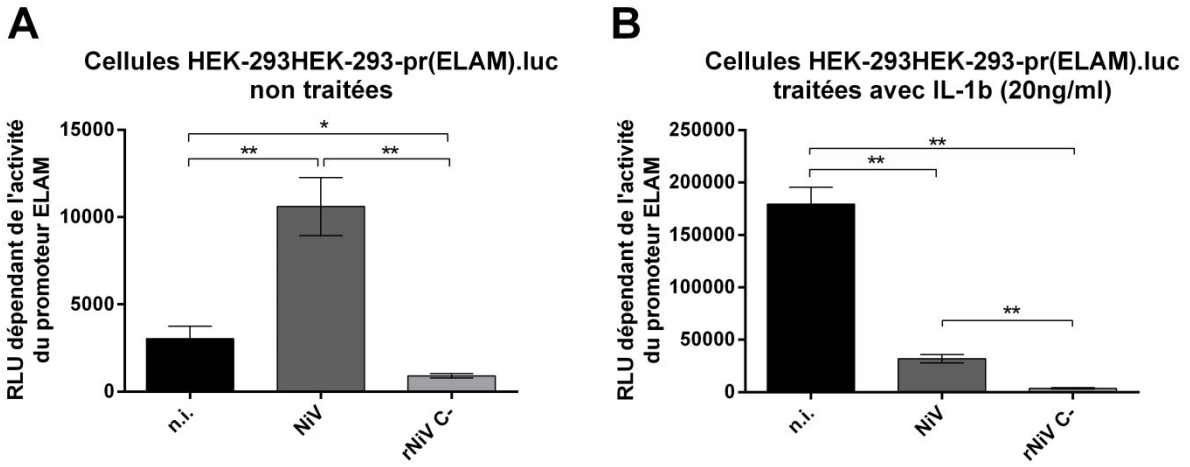


Figure 28 : Test fonctionnel avec gène rapporteur luciférase en contexte d'infection.

*Les cellules HEK- HEK-293-pr(ELAM).luc ont été soit infectées avec le virus Nipah ou avec le virus Nipah recombinant C-KO (rNiV C-) à une MOI de 1, 24h après ensemencement, soit non infectées (n.i.). (A) Les cellules n'ont pas été traitées et 30h après infection, l'activité de la luciférase Firefly a été mesurée (RLU). (B) Les cellules ont été traitées à l'IL-1β (20 ng/ml) 24h après infection et après 6h d'incubation, l'activité de la luciférase Firefly a été mesurée (RLU). (A et B) * = 0,001 < p < 0,05 et ** = 0,001 < p < 0,01. Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois en triplicats.*

L'activation de la voie canonique de NF-κB et de la voie d'AP1 a été réalisée par traitement des cellules à l'IL-1β, qui active le complexe des protéines IKKs par la même voie que les RLRs (Figure 26). Néanmoins, ces activations n'aboutissent pas aux mêmes signatures transcriptomiques. En effet, IL-1R et les RLRs activent différentes voies parallèles qui modulent leur réponse finale (Hayden et Ghosh, 2008). A noter également, que l'activation par l'IL-1β de la voie canonique de NF-κB et de la voie d'AP1, permet de se soustraire de l'inhibition de ces voies par la protéine V du virus Nipah via MDA5 (Melanoma Differentiation-associated Antigen 5) (Childs *et al*, 2007b). Dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc infectées par le virus Nipah et traitées 24h après l'infection à l'IL-1β (20 ng/µl) pendant 6h, l'activité du gène rapporteur est significativement inférieure à celle des cellules non infectées (p = 0,0025) (Figure 28. B). De plus, pour les cellules infectées par le virus recombinant C-KO, l'activité du promoteur est également inférieure à celle des cellules non infectées (p = 0,0027) et diminuée par rapport à celle des cellules infectées par le virus Nipah (p = 0,006) (Figure 28. B).

Ces résultats suggèrent que l'infection par le virus Nipah pourrait moduler l'activation des voies de NF-κB et qu'un rôle important pourrait être joué par la protéine C.

2. Effets des protéines non structurales du virus Nipah sur les voies de signalisation de NF-κB en contexte de transfection

Nous avons ensuite voulu confirmer le rôle de la protéine C sur la modulation des voies de NF-κB en contexte de transfection (Figure 29). Dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc transfectées avec le plasmide d'expression de la protéine C du virus Nipah et en l'absence de traitement à l'IL-1β, plus la concentration du plasmide augmente (50 ng, 100 ng et 200 ng), plus l'activité du gène rapporteur augmente (Figure 29. A). L'activité du gène rapporteur est significativement supérieure lors de la transfection de 200 ng du plasmide exprimant la protéine C ($p = 0,0013$) par rapport à l'activité du promoteur dans les cellules transfectées avec le vecteur vide. On retrouve les mêmes résultats dans le cas des cellules HEK-293-pr(ELAM).luc traitées à l'IL-1β (20 ng/µl) (Figure 29. B). L'activité du gène rapporteur est également augmentée lors de la transfection de 200 ng du plasmide exprimant la protéine C ($p < 0,0001$) par rapport à la transfection du vecteur vide.

Par la suite, nous avons voulu vérifier si les autres protéines non structurales du virus Nipah pouvaient jouer un rôle dans la modulation des voies de NF-κB. De façon similaire à ce qui a été observé avec la protéine C, les protéines P ($p = 0,0379$), V ($p = 0,0226$) et W ($p = 0,0078$) activent significativement le gène rapporteur dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc (Figure 29. C). A noter également que l'activité du gène rapporteur est augmentée lors de la transfection de 200 ng de plasmides exprimant la protéine W par rapport aux cellules transfectées avec 200 ng de plasmides exprimant les protéines P ($p = 0,0077$) et V ($p = 0,0083$). On retrouve les mêmes résultats dans le cas des cellules HEK-293-pr(ELAM).luc traitées à l'IL-1β (20 ng/µl) (Figure 29. D). L'activité du gène rapporteur est augmentée lors de la transfection de 200 ng des plasmides exprimant P ($p = 0,0049$), V ($p = 0,0005$) et W ($p < 0,0001$) par rapport à la transfection du vecteur vide. Dans les cellules traitées également, l'activité du gène rapporteur lors de l'expression de la protéine W est supérieure à celle lors de l'expression des protéines P ($p = 0,0023$) et V ($p < 0,0001$). Les résultats obtenus avec la protéine C ne peuvent être comparés à ceux obtenus avec les protéines P, V et W, puisque les vecteurs utilisés ne sont pas les mêmes (pCG pour P, V, W et pCAGGS pour C).

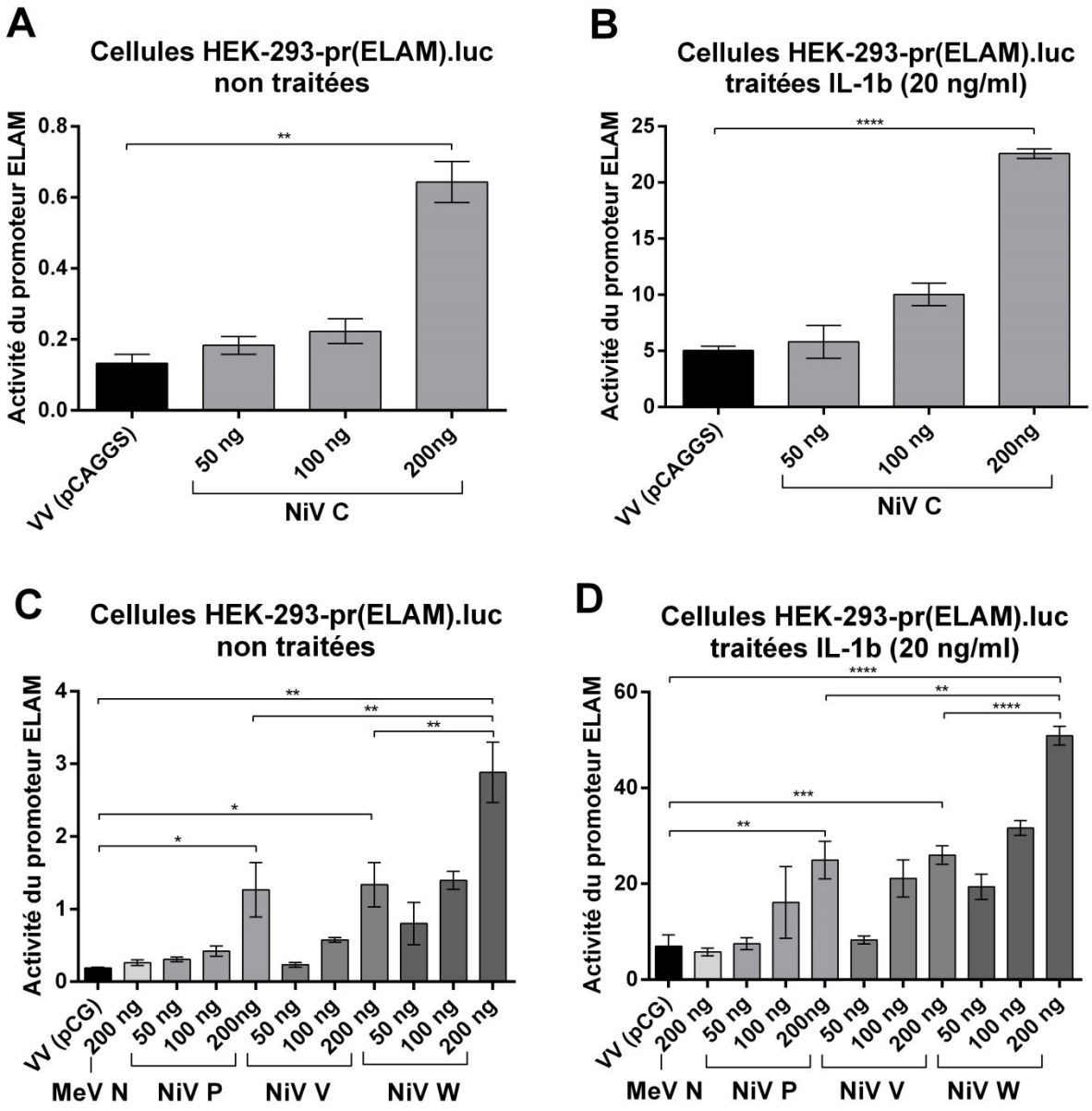


Figure 29 : Test fonctionnel avec gène rapporteur luciférase en contexte de transfection.

Les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc ont été soit transfectées avec un des plasmides codant pour les protéines P, V, W et C du virus Nipah à différentes concentrations (50 ng, 100 ng et 200 ng), soit transfectées avec 200 ng d'un plasmide pCG-MeVN exprimant la nucléoprotéine du virus de la Rougeole (MeV N), soit transfectées avec 200 ng du vecteur vide correspondant (VV, pCG ou pCAGGS). Les cellules ont également toutes été transfectées avec 20 ng d'un plasmide pHRL-tk exprimant la luciférase Renilla pour la normalisation du signal. Dans chaque puits, la concentration totale de plasmides a été ajustée en ajoutant le vecteur vide correspondant à celui codant pour la protéine virale (pCG pour les protéines P, V, W et pCAGGS pour la protéine C). (A et C) Les cellules n'ont pas été traitées et 30h après transfection, l'activité de la luciférase Firefly et de la luciférase Renilla ont été mesurées. (B et D) Les cellules ont été traitées à l'IL-1β (20 ng/ml) 24h après transfection et après 6h d'incubation, l'activité de la luciférase Firefly et de la luciférase Renilla ont été mesurées. (A, B, C et D) Une lecture de la luminescence sans ajout de substrat a été réalisée et l'activité du

*promoteur ELAM correspond au ratio (RLU Firefly – RLU blanc) / (RLU Renilla). * = 0,001 < p < 0,05 ; ** = 0,001 < p < 0,01 ; *** = 0.0001 < p < 0.001 ; **** = p < 0.0001. Cette expérience a été réalisée deux fois en triplicats et les résultats obtenus étaient reproductibles.*

Dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc transfectées avec 200 ng d'un plasmide pCG-MeV N exprimant la nucléoprotéine du virus de la Rougeole (Figure 29. C et D), il n'y a pas de différence significative entre les cellules transfectées avec le vecteur vide pCG et celles transfectées avec le plasmide pCG exprimant MeV N, que ce soit dans les cellules traitées ou non traitées (Figure 29. C et D). Ce résultat montre que l'expression d'une protéine cytoplasmique par transfection n'entraîne pas systématiquement l'activation du promoteur ELAM et que ce sont bien les protéines non structurales du virus Nipah, qui ont un effet spécifique sur l'activation du gène rapporteur. Ces données suggèrent que chacune des protéines non structurales du virus Nipah auraient un rôle dans la modulation des voies de NF-κB.

3. Interactions des protéines non structurales du virus Nipah avec les protéines IKKs

Afin d'explorer les interactions des protéines non structurales du virus Nipah avec les protéines des voies de signalisation de NF-κB, nous avons réalisé des tests de complémentation protéique (PCA) basés sur la luciférase de *Gaussia princeps* (Figure 30). Pour contrôler la validité de ces tests, un contrôle positif, correspondant à une interaction déjà décrite dans la littérature, a été réalisé : le contrôle choisi est l'interaction entre la nucléoprotéine N et la phosphoprotéine P du virus Nipah (Habchi *et al*, 2011). Dans l'interprétation des résultats de PCA, une interaction entre deux protéines est considérée positive quand le NLR est supérieur à 3,5 (Cassonnet *et al*, 2011). Néanmoins, ce seuil est à considérer avec précaution. Il a été déterminé dans un contexte expérimental donné, qui ne sont pas les conditions des PCA réalisées dans cette étude (cellules, expérimentateur, luminomètre, …). Il convient donc d'analyser les NLR obtenus par PCA par rapport au seuil fixé de 3.5, mais les interactions présentant des NLR proches du seuil de positivité seront à considérer avec prudence. Le NLR de notre contrôle (entre P et N du virus Nipah), est de 246,8 (Figure 30).

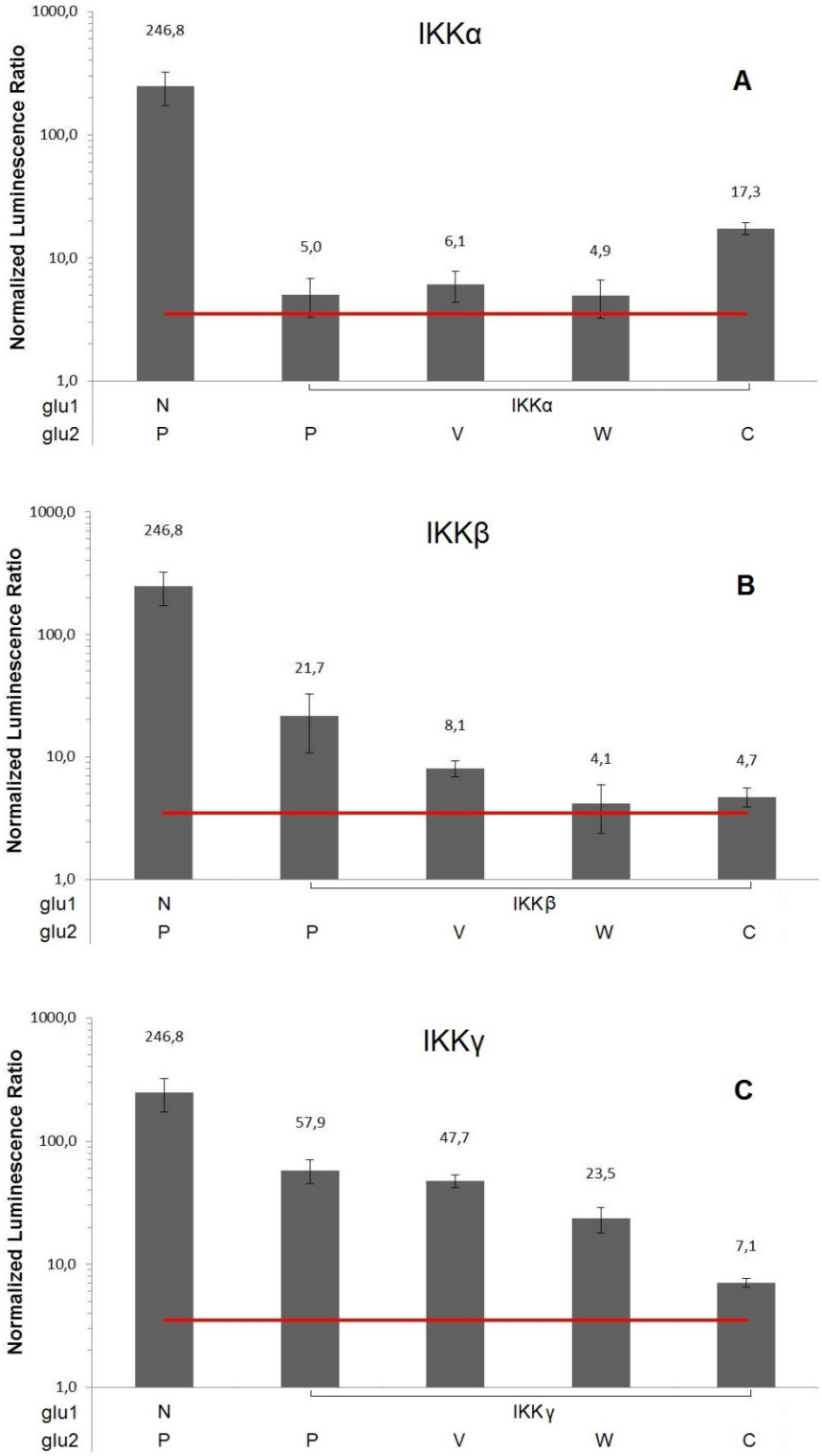


Figure 30 : Mesures par PCA des interactions entre les protéines du complexe IKK (IKKα (A), IKKβ (B) et IKKγ (C)), dont les domaines glu1 de la luciférase de Gaussia princeps sont en partie N-terminale, avec les protéines non structurales du virus Nipah (P, V, W et C) dont les domaines glu2 de la luciférase sont en partie N-terminale.

Les résultats correspondent aux NLR de chaque couple de protéines testé et la droite rouge horizontale représente le seuil de positivité de 3,5. Dans cette configuration (sous-

unités glu1 et glu2 en partie N-terminale), les PCA ont été réalisés deux fois et les résultats obtenus étaient reproductibles.

Toutes les PCA, présentés dans la Figure 30, ont été réalisés avec les sous-unités glu1 et glu2 en partie N-terminale des protéines d'intérêt et se sont focalisés sur les protéines IKKs, qui représentent des composants critiques de l'activation des voies de NF-κB (Hayden et Ghosh, 2008). De plus, une interaction entre la protéine C du virus Nipah et IKKα a déjà été décrite (Yamaguchi *et al*, 2014), ce que l'on retrouve dans la Figure 30. A (NLR de 17,3), et nous permet de valider notre méthode.

Nous avons ensuite exploré les interactions éventuelles entre les protéines non structurales du virus Nipah et les autres protéines de la famille des IKKs (IKKβ et IKKγ), qui ont un rôle prépondérant dans l'activation de la voie canonique de NF-κB. Les NLR obtenus permettent d'envisager des interactions entre la protéine IKKβ et la protéine P du virus Nipah (Figure 30. B) et entre les protéines P et V et la protéine IKKγ (Figure 30. C).

Afin de tester si la position des sous-unités glu (en partie N-terminale ou C-terminale) pouvait modifier les résultats obtenus, des PCA ont été réalisés pour toutes les combinaisons (résultats non présentés). Ainsi dans la conformation glu1 et glu2 en partie C-terminale, on observe une interaction entre la protéine IKKβ et la protéine V, déjà suggérée par les résultats de la Figure 30. B. De plus, dans les interactions entre la protéine C du virus Nipah et la protéine IKKα, on observe une baisse du signal dans le cas de la protéine IKKα couplée à la sous-unité glu1 en partie C-terminale.

Ces résultats suggèrent que les protéines IKKs pourraient être les partenaires des protéines non structurales du virus Nipah dans la modulation de NF-κB, aussi bien dans la voie canonique que dans la voie non canonique. Cependant, toutes les interactions protéiques suggérées par PCA seront confirmées par une autre méthode (co-immunoprécipitation par exemple) dans un avenir proche.

D. Analyse des résultats

Nos résultats montrent que le virus Nipah entraîne une activation du promoteur ELAM dans les cellules HEK-293-pr(ELAM).luc, en l'absence de stimulation par l'IL-1β, ce qui souligne une activation des voies de NF-κB (canonique et/ou non canonique) et/ou d'AP1 lors d'une infection par le virus (Figure 28**.** A). Lors de l'infection par le virus recombinant C-

KO, l'activation du promoteur ELAM est réduite et est même inférieure au niveau d'activation des cellules non infectées (Figure 28**.** A). Ces résultats suggèrent que la protéine C du virus Nipah aurait un rôle dans l'activation ou dans la levée de l'inhibition des voies de NF-κB et/ou d'AP1 et que, sans la protéine C, le virus Nipah limiterait l'activation d'une ou plusieurs de ces voies. L'activation de la voie canonique de NF-κB et/ou de la voie AP1 par le traitement à l'IL-1β est efficace, puisque l'activation du promoteur ELAM est augmentée dans les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées quelles que soient les conditions (Figure 28). A l'inverse des cellules non traitées, l'infection des cellules traitées par le virus Nipah entraîne une diminution de l'activité du gène rapporteur par rapport aux cellules traitées et non infectées (Figure 28**.** B). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : soit l'infection par le virus Nipah entraine une inhibition de la voie canonique de NF-κB et/ou de la voie d'AP1, soit les cellules infectées par le virus Nipah ne sont pas capables de répondre aussi efficacement que les cellules non infectées à la stimulation par l'IL-1β. Cette diminution de l'activité du promoteur ELAM est accentuée dans le cas de l'infection par le virus recombinant C-KO, ce qui confirmerait l'activation ou la levée d'inhibition des voies de NF-κB et/ou d'AP1 par la protéine C (Figure 28**.** B). Ces résultats sont néanmoins à considérer avec précaution dans la mesure où cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois pour le moment. Pour préciser l'effet du virus Nipah dans les cellules traitées à l'IL-1β, il conviendrait de normaliser le signal luciférase Firefly en transfectant un plasmide exprimant la luciférase Renilla (Dual-Glo® Luciferase Assay System de Promega). Cette normalisation n'a pas été réalisée dans un premier temps pour ne pas perturber (en transfectant des plasmides) le signal généré par le virus Nipah. La réalisation de ce test avec des virus recombinants V-KO et W-KO permettrait également de compléter ces premiers résultats.

Après avoir exploré les effets de l'infection par le virus Nipah sur les voies de NF-κB et d'AP1, il convient de confirmer l'implication des protéines non structurales dans la modulation de ces mêmes voies. En contexte de transfection, la protéine C du virus Nipah entraîne bien une activation du gène rapporteur, que ce soit en cellules traitées ou non traitées, ce qui est en conformité avec l'hypothèse d'une activation des voies de NF-κB (Figure 29. A et B). Cependant, la transfection des protéines P, V et W entraîne également une augmentation du signal du gène rapporteur, que ce soit avec ou sans traitement à l'IL-1β (Figure 29. C et D), avec une augmentation plus élevée dans le cas de la protéine W. Dans le

cas de la transfection de la nucléoprotéine du virus de la rougeole, il n'y a pas de différence entre l'activation du promoteur ELAM par le vecteur vide pCG et entre l'activation par le plasmide pCG exprimant MeV N (Figure 29. C et D). Ce n'est donc pas une production importante de protéines (stress cellulaire) dans le cytoplasme des cellules, qui active le promoteur. La transfection des protéines P, V et W du virus Nipah entraînerait donc bien l'activation des voies de NF-κB (canonique et/ou non canonique) et/ou d'AP1, ce qui confirmerait l'hypothèse de l'incapacité des cellules infectées à répondre aussi efficacement que les cellules non infectées à la stimulation par l'IL-1β (Figure 28**.** B). Les mêmes tests devront être réalisés avec un vecteur pCG exprimant la protéine C du virus Nipah afin de pouvoir comparer les niveaux d'activation des voies avec ceux obtenus avec les protéines P, V et W. La difficulté d'interprétation des résultats vient du fait que les voies de signalisation sont confondues en utilisant un gène rapporteur avec promoteur ELAM. De ce fait, pour préciser quelles protéines non structurales agissent sur quelles voies de signalisation, la réalisation d'un test fonctionnel de relocalisation nucléaire des sous-unités p65, p52 et c-Jun par un test de microscopie en flux avec ImagestreamX, en contexte de transfection, est en cours.

Des PCA ont été réalisés afin d'explorer les interactions des protéines non structurales du virus Nipah avec les protéines de la famille des IKKs. Dans les résultats de la Figure 30, toutes les interactions testées entre les protéines non structurales et les protéines de la famille des IKKs, présentent un NLR supérieur à 3,5. Les protéines P et V semblent donc interagir avec les protéines IKKβ et IKKγ (Figure 30. B et C). Ces résultats sont néanmoins à considérer avec précaution même si l'interprétation des résultats de la Figure 30 est confirmée par les différentes combinaisons réalisées (sous-unités glu1 et glu2 en partie N et C-terminale) (résultats non présentés). Toutes ces interactions sont en cours de confirmation par co-immunoprécipitation.

Partie VI. Discussion

I. Axe 1 : Rôle des Héparanes Sulfates dans l'infection aux Henipavirus

La dissémination rapide des Henipavirus au sein de leur hôte fait partie des critères qui expliquent leur très forte pathogénicité chez l'homme. Ainsi, nous nous sommes tout d'abord attachés à identifier les mécanismes de cette dissémination rapide et à trouver des molécules actives capables de ralentir la progression virale. Nous avons ainsi pu démontrer au cours de cette thèse que les Héparanes Sulfates (HS), présents à la surface de très nombreuses cellules jouent un rôle critique dans la dissémination virale. En effet, ces glyco-amino-glycanes permettent des mécanismes de trans-infection, par l'intermédiaire de cellules non sensibles telles que les leucocytes mais aussi l'infection *in cis* des cellules sensibles en favorisant certainement les interactions avec le récepteur viral, EFN B2 ou B3.

La capacité des HS à favoriser les infections virales a déjà pu être montrée pour de nombreux virus et se fait généralement par le biais d'interactions entre les HS et les glycoprotéines d'enveloppe. Ainsi, l'interaction entre les HS et la protéine d'enveloppe gp120 du VIH-1 (Mondor *et al*, 1998; Vives *et al*, 2005) ou la protéine A27L du virus de la vaccine (Chung *et al*, 1998) ont déjà pu être démontrées. De plus, ces interactions ont aussi été mises en évidence avec des glycoprotéines d'enveloppe de virus de la famille des *Paramyxoviridae* (dont font partie les Henipavirus) tels l'hémagglutinine du virus de la rougeole (Terao-Muto *et al*, 2008), la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial humain (hRSV) (Feldman *et al*, 2000) ou le métapneumovirus humain (Chang *et al*, 2012). Dans le cas du virus RSV bovin (bRSV) ou du virus de la maladie de Carré (CDV), il semblerait que les protéines H et F soient toutes deux capables d'une interaction avec les HS (Fujita *et al*, 2007; Karger *et al*, 2001). D'après nos résultats d'étude d'affinité par résonance de plasmons de surface, les HS interagiraient de façon très spécifique avec la protéine G du virus Nipah. Des analyses supplémentaires en utilisant de la protéine G recombinante devraient nous permettre d'identifier plus précisément les résidus protéiques à l'origine de cette interaction.

De façon similaire à ce qui a déjà pu être montré pour le VIH-1 (Mondor *et al*, 1998), l'interaction entre la protéine G du virus Nipah est particulièrement spécifique des HS et ne s'applique pas à d'autres composés GAGs sulfatés tels les Chondroïtines Sulfates (CS) ou les Dermatanes Sulfates (DS). Ceci suggère que les interactions démontrées vont bien au-delà de la simple interaction ionique liée à la présence de nombreux groupements sulfates sur la structure commune de ces GAGs. Il est par ailleurs tout à fait plausible que plusieurs sites d'interactions soient impliqués. En effet, dans le cas des papillomavirus, il a été démontré récemment que c'est un engagement séquentiel de 3 sites de fixation aux HS qui permet l'attachement viral, l'interaction avec le récepteur d'entrée et l'entrée du virus au sein de la cellule (Richards *et al*, 2013). Dans le cas du virus de la varicelle, il a été montré que les HS permettaient une stabilisation du virus à l'origine d'une meilleure accessibilité au récepteur d'entrée (Zhu *et al*, 1995). Ainsi, les HS pourraient jouer un rôle similaire dans le cadre d'une infection aux Henipavirus en favorisant le contact du virus avec son récepteur EFN-B2 ou B3 et dans la stabilisation de l'interaction virus / récepteur d'entrée (tels que montré dans la Figure 31 A.).

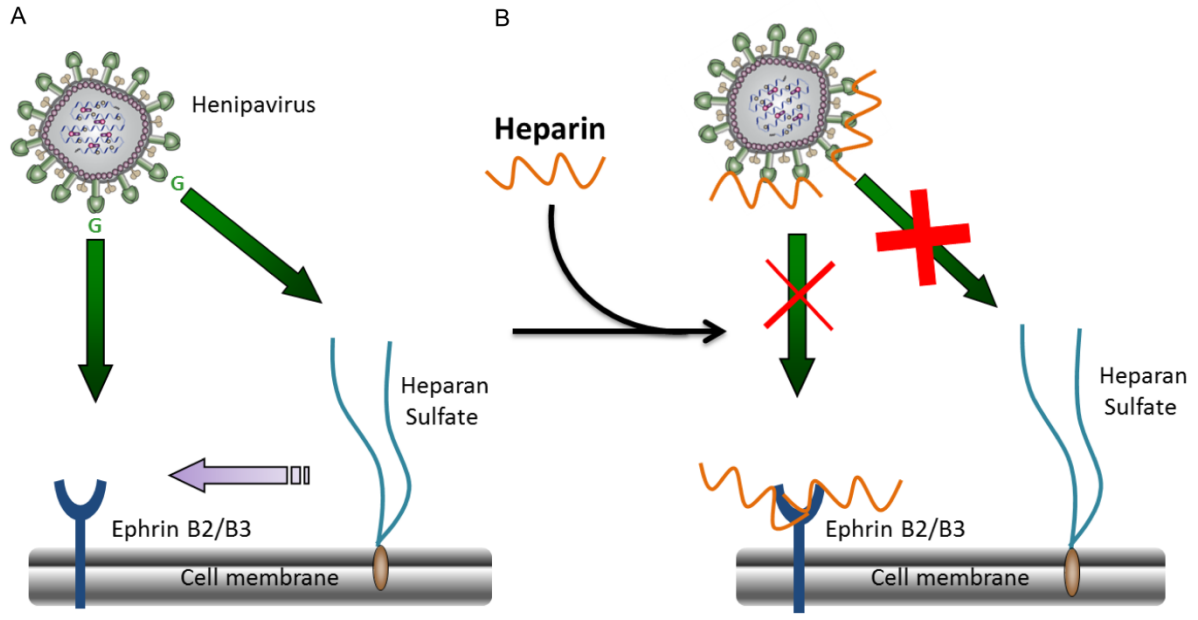


Figure 31 : Modèle d'action de l'héparine sur les Henipavirus et leurs récepteurs EFN-B2 et B3.

Au cours de ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que l'héparine était capable d'inhiber le phénomène de trans-infection *in vitro*. Grâce à sa structure très proche de celle des HS et ses nombreux groupements sulfates négativement chargés, l'héparine

pourrait se lier aux virus avec une meilleure affinité et agir en tant qu'inhibiteur compétitif de l'interaction virus / HS. En plus de ses capacités d'inhibition de la trans-infection, nous avons aussi pu montrer que l'héparine est capable de réduire une infection directe (*in* cis) des cellules sensibles. Nos études par résonance de plasmons de surface ainsi que des données récentes de la littérature (Holen *et al*, 2010) suggèrent que cette capacité pourrait être liée à des interactions entre l'héparine et EFN-B3, un des récepteurs d'entrée du virus Nipah. Ces résultats nous permettent de compléter le modèle proposé. L'héparine agirait donc sur trois tableaux que sont : la limitation de la trans-infection par inhibition compétitive de l'attachement du virus sur les HS des cellules non-permissives circulantes et la déstabilisation du complexe virus / récepteur d'entrée en agissant à la fois sur la protéine d'attachement du virus et sur le récepteur EFN-B3.

Bien que particulièrement efficace *in vitro*, l'utilisation de l'héparine dans le cadre d'un traitement *in vivo* reste un challenge d'envergure. En effet, cette molécule présente, d'une part, une activité anticoagulante bien connue dont les effets sur un organisme infecté par un virus cytolytique s'attaquant aux cellules de l'endothélium vasculaire pourraient être particulièrement délétères et, d'autre part, une pharmacocinétique et pharmacodynamie (PK/PD) difficile à contrôler tant la demi-vie est courte et les interactions aspécifiques sont nombreuses. Pour répondre à ces challenges, notre collaborateur a pu synthétiser une héparine dépourvue d'activité anticoagulante grâce à une modification induite par une oxydation au periodate. Concernant les aspects PK/PD, nous avons fait le choix de mettre au point un schéma thérapeutique nous permettant de tester des doses élevées sur une base journalière.

Comme expliqué précédemment, l'héparine est une molécule capable d'interagir avec un très grand nombre de protéines. Ainsi, en plus de son action sur la progression virale, l'héparine est aussi capable de modifier le contexte inflammatoire des zones d'infection en se liant à de nombreuses cytokines de l'inflammation. Parmi celles-ci, la chimiokine CXCL10 (Ranjbaran *et al*, 2006) est connue pour être un facteur particulièrement important dans le cadre d'une infection par les Henipavirus (Mathieu, Guillaume, Sabine, *et al*, 2012) et qui permet le recrutement des monocytes / macrophages, lymphocytes T et cellules NK. De plus, l'héparine, connue pour ses propriétés électronégatives liées à la présence de nombreux groupements sulfates, pourrait empêcher la fixation des leucocytes

sur l'endothélium en se fixant à un grand nombre de molécules d'adhésion telles que les sélectines (Koenig *et al*, 1998) ou CD11b/MAC1 (Salas *et al*, 2000). Enfin, il a aussi été montré que des molécules dérivées de l'héparine étaient capables de stabiliser la barrière endothéliale (Urbinati *et al*, 2008) et empêcher le passage des virus, anticorps et cellules effectrices de l'immunité à travers la barrière hémato-encéphalique (Bobardt *et al*, 2004). Ces processus annexes pourraient aussi expliquer les résultats obtenus *in vivo* dans l'amélioration des conditions de survie des individus traités.

L'inhibition de l'infection aux Henipavirus par l'héparine *in vitro* et, dans une moindre mesure, *in vivo* permet donc d'envisager l'utilisation de cette molécule en tant qu'antiviral. Cependant, avant d'en envisager l'utilisation clinique, de nombreuses améliorations restent à faire et il semble important d'identifier les moyens d'accroître les effets de l'héparine *in vivo*. Par exemple, la molécule PI-88, un analogue des HS beaucoup plus stable que l'héparine, fait preuve d'effets bénéfiques significatifs sur l'infection par le virus de la dengue et des flavivirus à encéphalites (Lee *et al*, 2006, p.-88). Ainsi, pour améliorer les effets thérapeutiques observés avec l'héparine, il conviendrait de tester des dérivés avec une structure analogue aux HS ou à l'héparine, mais dont la demi-vie est augmentée *in vivo*, dépourvus d'activité anticoagulante et avec une affinité potentiellement plus élevée à la protéine G des Henipavirus, tels que le PI-88 ou des dérivés de polysaccharides K5 d'*Escherichia coli* (Cagno *et al*, 2014). Cette preuve de concept ouvre donc la voie à de nouvelles approches thérapeutiques basées par exemple sur l'utilisation d'héparine ou de ses dérivés en co-traitement afin de ralentir la progression virale. Elle permet aussi d'envisager des approches de métaphylaxie dans le cas d'épizooties, comme celles ayant eu lieu chez le porc en Malaisie avec le virus Nipah ou le cheval en Australie avec le virus Hendra, en traitant l'intégralité du cheptel avant même l'apparition des signes cliniques, à partir du moment où le seuil épizootique est franchi.

D'une façon plus générale, cet axe de recherche révèle une nouvelle interaction entre les HS et les Henipavirus. Cette interaction joue un rôle important dans l'infection des cellules cibles du virus mais aussi dans sa dissémination au sein de l'organisme, en permettant sa fixation sur des cellules non-permissives qui vont agir en tant que cargo pour disséminer le virus de façon rapide et efficace via le flux sanguin. Néanmoins, si ces résultats nous éclairent sur la séquence de dissémination du virus au sein de l'organisme, il reste

toujours à déterminer comment le système immunitaire de l'hôte prend en charge l'infection par les Henipavirus.

II. Axe 2 : Etude de la pathogénèse des Henipavirus chez la souris

Pour étudier le rôle du système immunitaire dans le cadre d'une infection par les Henipavirus, nous avons tiré parti du fait que la souris possède les récepteurs nécessaires à l'infection par les Henipavirus et que son système immunitaire est capable de se débarrasser du virus en l'espace de quelques jours, ce qui n'est pas le cas des modèles habituels. En utilisant des approches de génie génétique, il est possible d'éliminer certains gènes impliqués dans la réponse immunitaire de la souris (génération de souris Knock-Out (KO)). En utilisant cette approche, on peut alors identifier les facteurs nécessaires à l'élimination du virus et donc à la survie des souris.

Nous nous sommes tout d'abord penchés sur le rôle de l'immunité innée, et tout particulièrement sur le rôle de l'interféron de type I (IFN-I), dans la réponse à l'infection par les Henipavirus. En effet, l'IFN-I possède un effet antiviral à plusieurs échelles en induisant l'expression de gènes antiviraux dans la cellule ou en augmentant l'activité des cellules présentatrices d'antigènes ou des lymphocytes. L'IFN-I intervient dans la défense de nombreuses populations cellulaires. Pour les neurones et les astrocytes, l'IFN-I aurait un effet protecteur à la fois vis-à-vis du virus mais aussi de l'inflammation qu'il provoque, en agissant notamment sur la voie NF-κB (Yang *et al*, 2000).

Nous avons pu montrer qu'une signalisation efficace de l'IFN-I est nécessaire à la survie des souris suite à une infection par les Henipavirus. Il est tout à fait envisageable que les mécanismes de neuroinvasion liés à la transmission du virus par la voie systémique ou par un transport axonal rétrograde soient amplifiés en l'absence du récepteur IFNAR, comme c'est le cas pour le virus de polio (Lancaster et Pfeiffer, 2010). On retrouve le même phénotype pour de nombreux autres virus neurotropiques à ARN, dont le virus de la stomatite vésiculeuse (Detje *et al*, 2009), le virus de la rougeole (Mrkic *et al*, 1998), les coronavirus neurotropiques (Ireland *et al*, 2008) ou le virus du Nil occidental (Samuel et Diamond, 2005), où l'infection de souris IFNAR KO conduit à une mortalité exacerbée. Nos études font apparaitre le même type de résultats. Les virus Nipah et Hendra sont tous deux

capables de se disséminer rapidement dans tout l'organisme une fois injectés par voie intrapéritonéale chez la souris IFNAR KO. Ils atteignent alors le cerveau où ils induisent les signes neurologiques à l'origine du décès des individus. De façon similaire à ce qui a été observé chez l'homme (Wong *et al*, 2009; Wong *et al*, 2002b), on note chez les souris IFNAR KO infectées une infection du parenchyme cérébral, une méningite, de la gliose, et de la vascularite. Les études histopathologiques ont aussi permis de mettre en évidence des hémorragies, une forte vascularite et inflammation généralisées dans de nombreux organes. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez le modèle de référence, le hamster doré (Wong *et al*, 2003), bien que la dose léthale 50 (LD_{50}) soit bien plus élevée chez la souris. Bien que les souris IFNAR-KO ne présentent pas un système immunitaire identique à celui des souris sauvages, à cause de leur inaptitude à réagir à l'IFN-I, elles sont capables de mettre en place une réponse immunitaire adaptative efficace, comme en témoigne la production d'anticorps neutralisants chez les souris IFNAR KO ayant survécu. Par ailleurs, ces souris ont déjà été utilisées à de nombreuses reprises dans l'évaluation de vaccins contre la dengue (Brandler *et al*, 2007), le SRAS (Liniger *et al*, 2008) ou le virus du Nil occidental (Despres *et al*, 2005).

Pour développer notre compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'une infection par les Henipavirus chez la souris, nous avons voulu identifier d'autres éléments critiques de la réponse immunitaire de la souris, indispensables à sa survie suite à l'injection d'une forte dose de virus par voie intrapéritonéale. Nous avons donc pu mettre en évidence l'importance des macrophages, dont les macrophages CD169+ qui permettent la détection précoce du virus, mais aussi celles des lymphocytes, plus particulièrement des lymphocytes T, qui permettent l'élimination définitive du virus.

De nombreuses études utilisant une approche similaire de déplétion des macrophages par des liposomes au clodronate ont montré l'importance de ces cellules lors d'une infection virale. Dans le cas du virus de la dengue, les macrophages jouent un rôle dual, car ils servent à la fois à répliquer le virus et à le contrôler. Une déplétion n'a alors que peu d'effet (Fink *et al*, 2009). Mais dans le cas d'un virus dont le tropisme ne touche pas les macrophages (ce qui est le cas des Henipavirus), le virus West Nile par exemple, la mortalité est exacerbée et accélérée lorsque les macrophages ont été détruits par l'action du clodronate (Purtha *et al*, 2008; Ben-Nathan *et al*, 1996). Lors de l'injection du virus dans le

péritoine, la première population cellulaire de l'immunité qu'il rencontre est essentiellement constituée de macrophages péritonéaux. Peu d'études s'attardent néanmoins sur le rôle de ces macrophages. Ils semblent jouer un rôle majeur dans les premières étapes de l'infection en tant qu'effecteurs directs de l'immunité innée (grâce à leur grande capacité phagocytique) mais ne permettent probablement pas à eux seuls de juguler l'infection. En effet, quelques minutes seulement après son inoculation (Nossal *et al*, 1968), le virus va être drainé par le système lymphatique jusqu'aux nœuds lymphatiques et arriver dans la zone sous capsulaire de cet organe. Dans cette zone, se trouvent des macrophages résidents, caractérisés par l'expression du marqueur CD169, dont la spécialité est la capture des antigènes particulaires (dont les virus) qui arrivent par voie lymphatique (Kuka et Iannacone, 2014). Ces macrophages sont capables d'un grand nombre de processus immunitaires aussi bien innés, avec la sécrétion massive d'interférons, qu'adaptatifs, avec l'activation des lymphocytes B et T de façon directe ou indirecte. La plupart des études s'accordent sur le fait que ce sont ces macrophages qui vont jouer un rôle majeur dans la suite du processus immunitaire antiviral. Une étude de la bibliographie sur le sujet fait apparaitre trois voies majeures d'action des macrophages sous-capsulaires.

Le premier révèle le rôle de ces macrophages dans l'initiation de la réponse innée au sein du nœud lymphatique. En effet, ils sont capables de sécréter de grandes quantités d'IFN-I qui vont protéger les cellules environnantes en les mettant dans un état antiviral (Iannacone *et al*, 2010). Cette sécrétion massive est à l'origine du recrutement d'autres cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Iannacone *et al*, 2010) ou des cellules de la famille des cellules lymphoïdes innées (iLC) comme les cellules NK (Garcia *et al*, 2012), notamment via la sécrétion d'IFN-γ. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle particulier de ces cellules dans la survie des souris à l'infection aux Henipavirus. En revanche, les résultats de survie observés chez les souris RAG2 cγ KO, en comparaison aux souris RAG2 KO, suggèrent tout de même un rôle des iLC. La littérature présente plusieurs occurrences sur le rôle des macrophages sous-capsulaires dans l'activation des cellules iNKT (invariant natural killer T cells) (Barral *et al*, 2010; Kawasaki *et al*, 2013). D'autres études insistent plus particulièrement sur la localisation topographique des macrophages sous-capsulaires et leurs interactions importantes avec les cellules lymphoïdes innées sous le contrôle de l'IL-17 (Gray *et al*, 2012) ou de l'IL-18 (Kastenmüller *et al*, 2012). Le rôle de ces cellules dans le cadre d'une infection par les

Henipavirus chez la souris ne peut donc pas être écarté et facilite très certainement la survie des individus infectés.

Le deuxième axe sur lequel les macrophages CD169$^+$ jouent un rôle est celui de l'activation des lymphocytes B. Ils sont en effet capables de capturer le virus arrivant par la lymphe, de le répliquer et d'en présenter les antigènes aux lymphocytes B présents dans les follicules sous-jacents. Plusieurs études basées sur l'utilisation du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) démontrent que suite à une injection sous-cutanée du virus, celui-ci se retrouve capturé par les macrophages sous-capsulaires en moins de 5 minutes (Junt *et al*, 2007; Phan *et al*, 2009; Martinez-Pomares et Gordon, 2012). Ils sont alors capables de présenter les antigènes viraux aux lymphocytes B et de les activer. En moins de 6 heures après l'infection, les lymphocytes B avaient migré dans la zone d'interface B/T du nœud lymphatique pour y subir leur changement de classe sous l'action des lymphocytes T CD4$^+$ (Junt *et al*, 2007). Néanmoins le rôle des macrophages sous-capsulaires dans l'initiation et l'affinage de la réponse humorale reste à éclaircir et fait toujours l'objet de controverses entre les spécialistes du sujet (Kuka et Iannacone, 2014). Dans le cas d'une infection aux Henipavirus chez la souris, les lymphocytes B ne semblent pas jouer de rôle majeur dans la réponse immunitaire puisque les souris µMT KO (dépourvues de lymphocytes B) survivent à l'infection. Ces résultats apparaissent comme contradictoires avec une étude qui montre que les lymphotoxines produites par les lymphocytes B sont essentielles au maintien des macrophages sous-capsulaires et que les souris µMT possèdent 10 fois moins de ces cellules. Le phénotype de ces macrophages chez la souris µMT seraient par ailleurs légèrement différent (Phan *et al*, 2009). Néanmoins, une étude plus récente constate que ce défaut quantitatif et qualitatif ne remet pas en cause les capacités de filtration et de présentation du virus (Moseman *et al*, 2012). La mortalité observée est plutôt liée à l'incapacité du virus de se répliquer au sein de ces macrophages, évènement démontré comme indispensable à la survie des souris (Honke *et al*, 2012). Dans ce contexte, on peut aussi se poser la question du rôle de la protéine Usp18 qui va empêcher la signalisation de la voie JAK/STAT à l'origine de la synthèse de protéines antivirales et donc permettre l'infection des macrophages CD169$^+$ (Ritchie *et al*, 2004). Conformément à nos observations sur le virus Nipah, l'étude de Moseman *et al.* prouve aussi que l'immunité humorale seule n'est pas indispensable à la survie des animaux.

Le troisième et dernier axe d'action des macrophages sous-capsulaires sur la réponse immunitaire concerne la réponse adaptative cellulaire. En effet, les macrophages $CD169^+$ sont impliqués dans l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ à travers au moins deux mécanismes différents : la présentation croisée d'antigènes par les cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ dans la rate et la présentation directe des antigènes aux lymphocytes T $CD8^+$. Les mécanismes mis en jeu lors de ces présentations directe ou indirecte ne sont pas encore bien connus. Néanmoins, la communauté scientifique s'accorde sur le fait que les macrophages $CD169^+$ sont capables d'internaliser, de préparer et de présenter les antigènes via le CMH-I (Martinez-Pomares et Gordon, 2012). La présentation croisée par les cellules dendritiques $CD8\alpha^+$ conduirait préférentiellement à l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (Backer *et al*, 2010) plutôt que des $CD4^+$. Les macrophages sous-capsulaires seraient aussi capables de présenter l'antigène directement auprès des lymphocytes T. Cela a pu être montré dans le cadre de l'immunité anti-tumorale (Asano *et al*, 2011) et la présentation directe via le CMH-I d'antigènes viraux capables d'infecter ces macrophages reste une hypothèse probable (Kuka et Iannacone, 2014). Néanmoins ce sujet fait toujours débat au sein de la communauté scientifique et plusieurs publications révèlent que les macrophages $CD169^+$ sont essentiels dans la capture des particules virales mais ne sont pas indispensables pour le développement d'une réponse T spécifique contre le virus du Nil Occidental (Winkelmann *et al*, 2014) ou contre *Listeria monocytogenes* (Aichele *et al*, 2003). Dans le cas de l'infection des souris par le virus Nipah, nous avons pu montrer le rôle crucial des lymphocytes T dans la survie des souris. Néanmoins le rôle direct des macrophages $CD169^+$ sur leur activation reste à démontrer.

En conclusion sur cette partie, on peut dire que les macrophages $CD169^+$ jouent bien un rôle décisif dans la physiopathologie de l'infection par le virus Nipah chez la souris (des expériences préliminaires de déplétion spécifique de ces cellules le prouvent). En agissant à l'interface de l'immunité innée et adaptative, dans les toutes premières phases de l'infection, le comportement de ces cellules va fortement influencer l'issue de l'infection. C'est donc en véritable chefs d'orchestres de l'immunité qu'elles vont non seulement être des acteurs de l'immunité innée mais aussi coordonner le recrutement des autres populations impliquées dans la réponse immunitaire adaptative.

III. Axe 3 : Perturbation des voies de signalisation de l'immunité innée par les protéines non structurales des Henipavirus

NF-κB est le principal régulateur de la réponse inflammatoire (Oeckinghaus *et al*, 2011) mais peu de données sont disponibles quant aux effets éventuels des protéines non structurales du virus Nipah sur ces voies. Certaines études de notre équipe suggèrent l'importance de la protéine C dans la régulation des voies de signalisation de NF-κB (Mathieu, Guillaume, Volchkova, *et al*, 2012a) et l'étude de la modulation de ces voies semble particulièrement intéressante pour mieux comprendre la réponse immunitaire et inflammatoire associée à une infection par les Henipavirus. De plus, les protéines non structurales des paramyxovirus sont connues pour interagir avec les cascades de signalisation de l'immunité innée (Audsley, 2013). Tous ces éléments amènent à explorer les effets des protéines non structurales du virus Nipah sur les cascades de signalisation de NF-κB.

Les différences de production des protéines non structurales, en contexte d'infection et en contexte de transfection (Virtue *et al*, 2011), montrent l'importance de rechercher dans un premier temps les effets de l'infection du virus Nipah sur les voies de signalisation étudiées. Ainsi, les résultats obtenus en contexte de transfection sont à considérer avec précaution car ils ne reflètent pas toujours la réalité physiologique (Schuhmann *et al*, 2011; Vijayan *et al*, 2014). En effet, il a été montré que le niveau d'expression des protéines non structurales est différent en contexte d'infection par rapport au contexte de transfection (Virtue *et al*, 2011) et que toutes les protéines non structurales n'ont pas le même niveau d'expression en contexte d'infection (Lo *et al*, 2009). La cinétique d'expression des protéines non structurales doit également être prise en compte : une activation et une répression des voies de signalisation peuvent être observées à différents temps de l'infection de la cellule par un même virus (Vijayan *et al*, 2014). Enfin, la nécessité d'une action conjointe des différentes protéines non structurales du virus Nipah dans la perturbation des voies de signalisation ne peut pas être exclue.

L'interprétation des résultats de PCA n'est pas toujours évidente car le seuil de 3,5 a été déterminé dans un contexte expérimental donné (Cassonnet *et al*, 2011) et est donc à considérer avec précaution. Nonobstant, l'interaction, déjà décrite par co-immunoprécipitation entre la protéine C du virus Nipah et la protéine IKKα (Yamaguchi *et al*,

2014), semble être confirmée (Figure 30. A). Dans le cas de l'interaction entre les protéines C et IKKα couplée à la sous-unité glu1 en partie C-terminale, le NLR obtenu est diminué (résultats non présentés). On peut avancer les hypothèses suivantes : dans cette conformation, les sous-unités glu se trouvent trop éloignées pour rétablir leur activité ou que la partie C-terminale d'IKKα est nécessaire à une interaction efficace avec la protéine C. On peut envisager que les résultats hétérogènes obtenus pour les interactions de P et V avec IKKβ suggèrent plutôt une interaction indirecte via la protéine IKKγ, avec laquelle les NLR obtenus sont très élevés pour ces deux protéines non structurales. En effet, la présence des protéines endogènes, dans la cellule, autorise à envisager la formation de complexes permettant le rapprochement des protéines transfectées (par exemple un complexe glu1-IKKβ – IKKγ - glu2-NiV P).

L'hypothèse peut être posée que la protéine C module la voie non canonique de NF-κB puisqu'elle interagit avec IKKα et que les protéines P, V et W modulent la voie canonique de NF-κB via IKKγ (propriétés partagées du fait de leur partie N-terminale commune) (Figure 32). La distribution cellulaire de la protéine W dans les cellules épithéliales est nucléaire (Lo *et al*, 2009), mais il est possible qu'en contexte de transfection, la protéine W se retrouve également dans le cytoplasme. Une interaction entre la protéine W du virus Nipah et la protéine IKKγ n'est pas dénuée de sens, dans la mesure où la distribution cytoplasmique de W a été décrite dans des cellules endothéliales (Lo *et al*, 2010). Néanmoins, l'existence de partenaires nucléaires à la protéine W, pouvant expliquer ses effets sur les voies de NF-κB et/ou d'AP1, n'est pas à écarter. D'une façon générale, il est possible que les protéines non structurales du virus Nipah interagissent avec d'autres protéines des cascades de signalisation de NF-κB et d'AP1, en plus des interactions suggérées avec les IKKs.

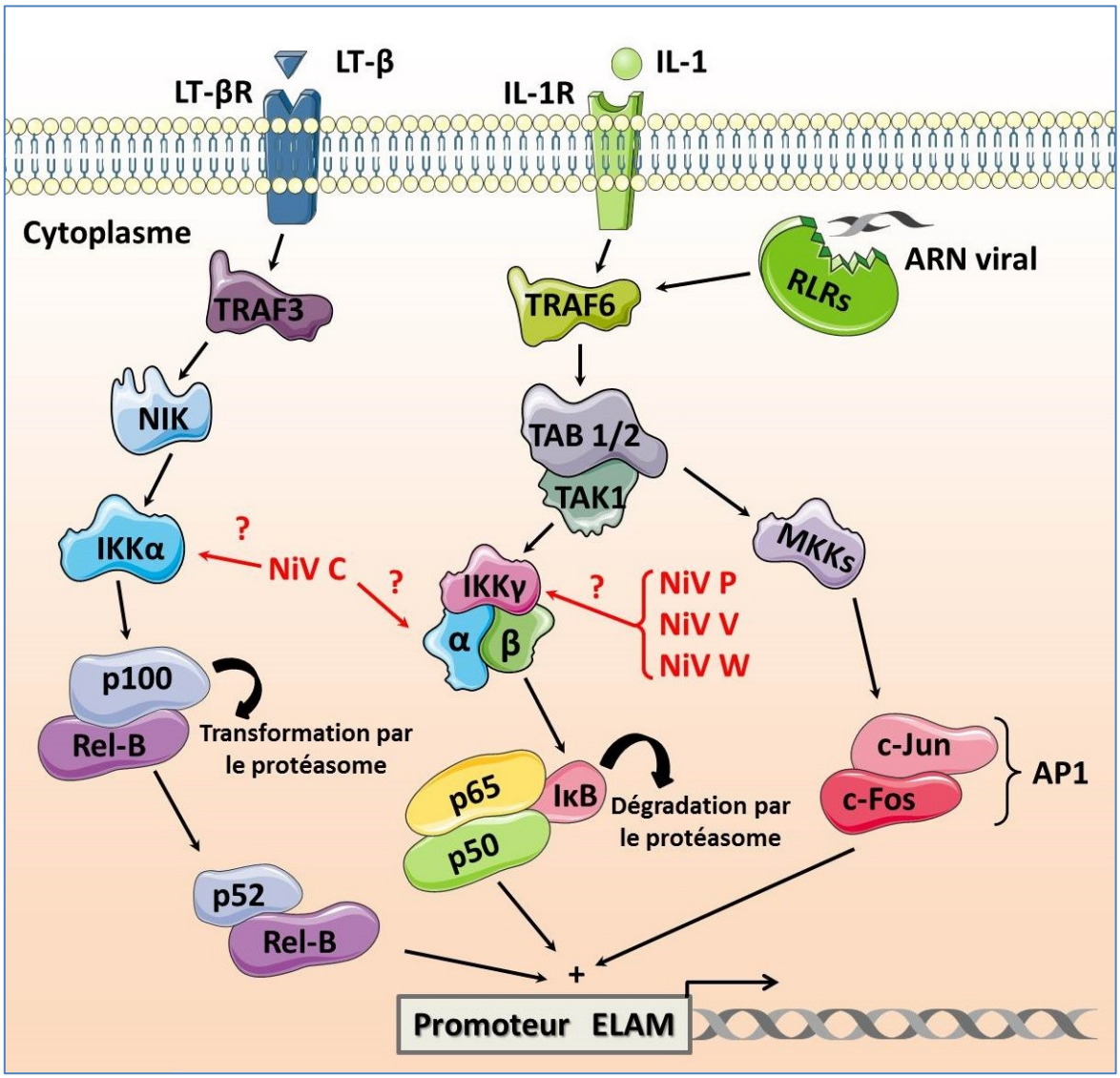


Figure 32 : Représentation simplifiée de l'activation du promoteur ELAM par les voies de NF-κB (canonique et non canonique) et la voie d'AP1 (Activator protein 1), ainsi que les niveaux d'action supposés des protéines non structurales du virus Nipah dans ces voies.

Cette méthodologie nous a donc permis de suggérer le rôle des protéines non-structurales du virus Nipah sur les voies de signalisation NF-κB chez l'homme. Elle révèle un grand nombre de pistes intéressantes dont l'exploitation pourrait conduire à une meilleure caractérisation de la réponse immunitaire innée.

Bien que les récepteurs d'entrée du virus soient extrêmement bien conservés d'une espèce à l'autre, les grandes différences de pathogénie que l'on observe par exemple entre l'homme, particulièrement sensible, et la souris, qui élimine très rapidement le virus sans en éprouver les symptômes, reste à l'heure actuelle un mystère. Nous avons montré précédemment l'importance du système immunitaire inné dans la prise en charge de l'infection par l'hôte. Une des hypothèses que nous avançons est que la différence de

pathogénie observée entre les espèces pourrait résulter, au moins partiellement, de différences d'interaction entre les protéines virales et les protéines impliquées dans les cascades de signalisation de l'immunité innée de l'hôte. En effet, ces interactions hôtes – pathogènes peuvent se révéler tout à fait différentes chez deux espèces éloignées comme l'homme et la souris et dont les protéines d'intérêt ne présentent que peu d'homologie.

Tableau 5 : Pourcentage d'homologie des protéines de l'immunité innée entre l'homme et la souris.

Gène d'intérêt	Pourcentage d'homologie protéique
IKKα	95,436 %
IKKβ	20,995 %
IKKγ	86,635 %
IKKε	82,476 %
TBK1	94,102 %
STAT1	92,267 %
STAT2	64,232 %
IRF3	70,492 %
IRF7	61,188 %
IRF9	67,407 %

L'expertise développée par notre laboratoire sur la technique de test de complémentation protéique en cellules de mammifères basée sur la reconstruction de l'activité de la luciférase *Gaussia princeps* nous permet de cribler les interactions entre les protéines non-structurales du virus Nipah et un bon nombre de protéines des voies de signalisations TLR/RLR, Jak/STAT et NF-κB, impliquées dans l'immunité innée, chez l'homme et la souris. En outre, ces expériences pourront être menées aussi pour comparer les interactions protéiques chez l'hôte réservoir asymptomatique, la chauve-souris frugivore, afin de voir si ces différences peuvent expliquer la capacité des chauves-souris à héberger le virus sans en subir les conséquences cliniques. Ces travaux préliminaires ne sont pas présentés à l'occasion de cette thèse mais font partie des perspectives qu'elle engendre.

Conclusion

En conclusion, les Henipavirus représentent un enjeu important pour les années à venir et la recherche sur ces virus doit nous permettre d'être prêt à faire face à ces fléaux, aussi bien à la suite d'une pandémie internationale que d'une attaque bioterroriste.

L'étude du comportement du virus avec les Héparanes sulfates nous a permis de mieux caractériser un mode de dissémination important du virus au sein de l'organisme. En outre, ces études nous permettent d'envisager l'optimisation de ces composés pour une application clinique à visée prophylactique tout particulièrement. Etant donné le mécanisme d'inhibition compétitif des composés glyco-amino-glycanes sur le virus, l'utilisation de ceux-ci en complément d'un autre traitement pourrait présenter des aspects synergétiques intéressants.

L'avancée des savoirs passe, en virologie, par l'utilisation de modèles animaux fiables et exploitables aussi bien sur le plan clinique que microscopique et fonctionnel. Les modèles souris présentés sont donc de nouveaux modèles prometteurs dont l'utilisation permettra d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie des Henipavirus et les relations hôte-pathogène. Ils ont déjà permis de mettre en évidence le rôle clé de l'interféron de type-I et des lymphocytes T ainsi que des macrophages $CD169^{+}$. Ces nouveaux modèles murins possèdent aussi de nombreux avantages par rapport aux modèles animaux existants pour l'étude des Henipavirus. En effet, ils fournissent des animaux dont le fond génétique est contrôlé, dont la manipulation est facile et qui peuvent être utilisés avec un coût financier et éthique raisonnable. Enfin, l'utilisation de certains de ces modèles est envisageable pour l'étude et la découverte de nouveaux traitements prophylactiques et thérapeutiques ainsi que pour le criblage de candidats médicaments et vaccins potentiels.

L'étude du comportement viral à l'échelle de l'organisme est indispensable pour comprendre les dynamiques immunitaires qui entrent en jeu lors d'une infection virale. Néanmoins, à l'échelle moléculaire, de nombreux phénomènes peuvent aussi participer à l'expression de la maladie sous une forme plus ou moins grave. Ainsi, l'étude de l'effet du virus Nipah sur la voie de signalisation NF-κB a permis de montrer que le virus est capable de perturber cette voie fondamentale à l'origine de l'initialisation d'une réponse immunitaire complexe et adaptée.

Bibliographie

A-Gonzalez N. et al, 2013. The nuclear receptor LXRα controls the functional specialization of splenic macrophages. Nat. Immunol., 14, 831‑839.

Aichele P. et al, 2003. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. J. Immunol., 171, 1148‑1155.

Ali R. et al, 2001. Nipah virus among military personnel involved in pig culling during an outbreak of encephalitis in Malaysia, 1998-1999. Emerg. Infect. Dis., 7, 759‑761.

Anon, 2011. Hendra virus, equine - Australia (21): (QL) canine. ProMed Mail, Archive Number: 20110802.2324.

Anon, Human Development Reports (HDR) – United Nations Development Programme (UNDP). Consultable : http://hdr.undp.org/en/ [Consulté le 31 juillet 2011a].

Anon, ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release. Consultable : http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1 [Consulté le 5 novembre 2011b].

Anon, 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals : mammals, birds, and bees. OIE, Paris, 6th ed., 1344-1355 p.

Anon, 1999. Outbreak of Hendra-like virus—Malaysia and Singapore, 1998–1999. M Mortal Wkly Rep, 13, 265‑269.

Anon, The Human Protein Atlas. Consultable : http://www.proteinatlas.org/ENSG00000125266 [Consulté le 25 août 2011c].

Asano K. et al, 2011. CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. Immunity, 34, 85‑95.

Audsley M.D., 2013. Paramyxovirus evasion of innate immunity: Diverse strategies for common targets. World J. Virol., 2, 57.

Backer R. et al, 2010. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 216‑221.

Barral P. et al, 2010. CD169+ macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes. Nat. Immunol., 11, 303‑312.

Bishop J.R., Schuksz M., Esko J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. Nature, 446, 1030‑7.

Blocquel D., Beltrandi M., Erales J., Barbier P., Longhi S., 2013. Biochemical and structural studies of the oligomerization domain of the Nipah virus phosphoprotein: Evidence for an elongated coiled-coil homotrimer. Virology, 446, 162‑172.

Blum L.S., Khan R., Nahar N., Breiman R.F., 2009. In-depth assessment of an outbreak of Nipah encephalitis with person-to-person transmission in Bangladesh: implications for prevention and control strategies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 80, 96‑102.

Bobardt M.D. et al, 2004. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. J. Virol., 78, 6567‑6584.

Bogunovic M. et al, 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. Immunity, 31, 513‑525.

Bonaparte M.I. et al, 2005. Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102, 10652‑10657.

Bossart K., 2008. Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. Virology, 372, 357‑371.

Bossart K.N. et al, 2011. A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. Sci. Transl. Med., 3, 105ra103.

Bossart K.N. et al, 2009. A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection. PLoS Pathog., 5, e1000642.

Bossart K.N., Wang L.F., Eaton B.T., Broder C.C., 2001. Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus. Virology, 290, 121‑35.

Bowden T.A. et al, 2008. Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a template for antiviral and vaccine design. J. Virol., 82, 11628‑11636.

Brandler S. et al, 2007. Pediatric measles vaccine expressing a dengue antigen induces durable serotype-specific neutralizing antibodies to dengue virus. PLoS Negl. Trop. Dis., 1, e96.

Bray M., 2001. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. J. Gen. Virol., 82, 1365‑73.

Breed A.C., Breed M.F., Meers J., Field H.E., 2011. Evidence of Endemic Hendra Virus Infection in Flying-Foxes (Pteropus conspicillatus)—Implications for Disease Risk Management. PLoS ONE, 6, e28816.

Van den Broek M.F., Müller U., Huang S., Zinkernagel R.M., Aguet M., 1995. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. Immunol. Rev., 148, 5‑18.

Bruhn J.F. et al, 2014. Crystal Structure of the Nipah Virus Phosphoprotein Tetramerization Domain. J. Virol., 88, 758‑762.

Cagno V. et al, 2014. Highly Sulfated K5 Escherichia coli Polysaccharide Derivatives Inhibit Respiratory Syncytial Virus Infectivity in Cell Lines and Human Tracheal-Bronchial Histocultures. Antimicrob. Agents Chemother., 58, 4782‑4794.

Cassonnet P. et al, 2011. Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein complexes. Nat. Methods, 8, 990‑992.

Center for Disease Control, Center for Disease Control (CDC). Consultable : http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#c [Consulté le 6 avril 2011].

Chadha M.S. et al, 2006. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. Emerg. Infect. Dis., 12, 235‑240.

Chang A., Masante C., Buchholz U.J., Dutch R.E., 2012. Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. J. Virol., 86, 3230‑3243.

Chan Y.P., Koh C.L., Lam S.K., Wang L.-F., 2004. Mapping of domains responsible for nucleocapsid protein-phosphoprotein interaction of Henipaviruses. J. Gen. Virol., 85, 1675‑1684.

Chew M.H. et al, 2000. Risk factors for Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore. J. Infect. Dis., 181, 1760‑1763.

Childs K. et al, 2007a. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. Virology, 359, 190‑200.

Childs K. et al, 2007b. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. Virology, 359, 190‑200.

Childs K., Randall R., Goodbourn S., 2012. Paramyxovirus V proteins interact with the RNA Helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction. J. Virol., 86, 3411‑3421.

Childs K.S., Andrejeva J., Randall R.E., Goodbourn S., 2009. Mechanism of mda-5 Inhibition by paramyxovirus V proteins. J. Virol., 83, 1465‑1473.
Chong H.T. et al, 2002. Nipah encephalitis outbreak in Malaysia, clinical features in patients from Seremban. Can. J. Neurol. Sci., 29, 83‑87.
Chong H.T., Hossain M.J., Tan C.T., 2008. Differences in epidemiologic and clinical features of Nipah virus encephalitis between the Malaysian and Bangladesh outbreaks. Neurol. Asia, 23 ‑ 26.
Chow V.T.K., Tambyah P.A., Yeo W.M., Phoon M.C., Howe J., 2000. Diagnosis of Nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid. J. Clin. Virol., 19, 143‑147.
Chua K.B. et al, 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. The Lancet, 354, 1257‑1259.
Chua K.B. et al, 2000. Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. Science, 288, 1432‑1435.
Chua K.B., 2003. Nipah virus outbreak in Malaysia. J. Clin. Virol., 26, 265‑275.
Chua K.B., 2010. Risk factors, prevention and communication strategy during Nipah virus outbreak in Malaysia. Malays. J. Pathol., 32, 75‑80.
Chung C.S., Hsiao J.C., Chang Y.S., Chang W., 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. J. Virol., 72, 1577‑1585.
Ciancanelli M.J., Basler C.F., 2006. Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. J. Virol., 80, 12070‑12078.
Ciancanelli M.J., Volchkova V.A., Shaw M.L., Volchkov V.E., Basler C.F., 2009. Nipah Virus Sequesters Inactive STAT1 in the Nucleus via a P Gene-Encoded Mechanism. J. Virol., 83, 7828‑7841.
Communie G. et al, 2013. Atomic Resolution Description of the Interaction between the Nucleoprotein and Phosphoprotein of Hendra Virus. PLoS Pathog, 9, e1003631.
Davies L.C., Jenkins S.J., Allen J.E., Taylor P.R., 2013. Tissue-resident macrophages. Nat. Immunol., 14, 986‑995.
Despres P. et al, 2005. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis. J. Infect. Dis., 191, 207‑14.
Detje C.N. et al, 2009. Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. J. Immunol., 182, 2297‑2304.
Dhondt K.P. et al, 2013. Type I interferon signaling protects mice from lethal henipavirus infection. J. Infect. Dis., 207, 142‑151.
Dhondt K.P., Horvat B., 2013. Hendra and Nipah viruses. In : CABI (Eds), Mononegavirales of Veterinary Importance - Pathobiology and Molecular Diagnosis, 38‑51.
Dhondt K.P., Horvat B., 2013. Henipavirus Infections: Lessons from Animal Models. Pathogens, 2, 264‑287.
Drexler J.F. et al, 2012. Bats host major mammalian paramyxoviruses. Nat. Commun., 3, 796.
Dups J. et al, 2012. A new model for hendra virus encephalitis in the mouse. PloS One, 7, e40308.
Dups J. et al, 2014. Subclinical infection without encephalitis in mice following intranasal exposure to Nipah virus-Malaysia and Nipah virus-Bangladesh. Virol. J., 11, 102.
Eaton B.T., Broder C.C., Middleton D., Wang L.-F., 2006. Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. Nat Rev Micro, 4, 23‑35.
Enserink M., 2000. Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. Science, 289, 518‑519.

Epstein J.H. et al, 2006. Feral cats and risk for Nipah virus transmission. Emerg. Infect. Dis., 12, 1178‑1179.
Epstein J.H. et al, 2008. Henipavirus infection in fruit bats (Pteropus giganteus), India. Emerg. Infect. Dis., 14, 1309‑1311.
Farrar J.J., 1999. Nipah-virus encephalitis—investigation of a new infection. The Lancet, 354, 1222‑1223.
Feldman S.A., Audet S., Beeler J.A., 2000. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate. J. Virol., 74, 6442‑6447.
Field H. et al, 2011. Hendra virus infection dynamics in Australian fruit bats. PloS One, 6, e28678.
Field H. et al, 2001. The natural history of Hendra and Nipah viruses. Microbes Infect., 3, 307‑314.
Fields B., 2007. Fields virology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5th ed.,
Fink K. et al, 2009. Depletion of macrophages in mice results in higher dengue virus titers and highlights the role of macrophages for virus control. Eur. J. Immunol., 39, 2809‑2821.
Fujita K. et al, 2007. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. Virology, 359, 324‑35.
Garcia Z. et al, 2012. Subcapsular sinus macrophages promote NK cell accumulation and activation in response to lymph-borne viral particles. Blood, 120, 4744‑4750.
Geisbert T.W. et al, 2010. Development of an Acute and Highly Pathogenic Nonhuman Primate Model of Nipah Virus Infection. PLoS ONE, 5, e10690‑e10690.
Gerlier D., 2011. Emerging zoonotic viruses: new lessons on receptor and entry mechanisms. Curr. Opin. Virol., 1, 27‑34.
Gilliet M., Cao W., Liu Y.-J., 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat. Rev. Immunol., 8, 594‑606.
Ginhoux F., Jung S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat. Rev. Immunol., 14, 392‑404.
Goh K.J. et al, 2000. Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. N. Engl. J. Med., 342, 1229‑1235.
Gray E.E., Friend S., Suzuki K., Phan T.G., Cyster J.G., 2012. Subcapsular Sinus Macrophage Fragmentation and CD169+ Bleb Acquisition by Closely Associated IL-17-Committed Innate-Like Lymphocytes. PLoS ONE, 7, e38258.
Guillaume V. et al, 2004. Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. J. Virol., 78, 834‑40.
Gurley E.S. et al, 2007. Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. Emerg. Infect. Dis., 13, 1031‑7.
Habchi J. et al, 2011. Characterization of the Interactions between the Nucleoprotein and the Phosphoprotein of Henipavirus. J. Biol. Chem., 286, 13583‑13602.
Hahn M.B. et al, 2014. The role of landscape composition and configuration on Pteropus giganteus roosting ecology and Nipah virus spillover risk in Bangladesh. Am. J. Trop. Med. Hyg., 90, 247‑255.
Hall L., 2000. Flying foxes : fruit and blossom bats of Australia. UNSW Press, Sydney,

Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S., 2000. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. J. Gen. Virol., 81, 1927‑1932.

Harcourt B.H. et al, 2005. Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. Emerg. Infect. Dis., 11, 1594‑7.

Harcourt B.H. et al, 2000. Molecular Characterization of Nipah Virus, a Newly Emergent Paramyxovirus. Virology, 271, 334‑349.

Harcourt B.H. et al, 2001. Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus. Virology, 287, 192‑201.

Harit A.K. et al, 2006. Nipah/Hendra virus outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001. Indian J. Med. Res., 123, 553‑560.

Hashimoto D. et al, 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. Immunity, 38, 792‑804.

Hayden M.S., Ghosh S., 2008. Shared Principles in NF-κB Signaling. Cell, 132, 344‑362.

Hayman D.T.S. et al, 2011. Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in ghana, west Africa. PloS One, 6, e25256.

Hayman D.T.S. et al, 2008. Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. PloS One, 3, e2739.

Holen H.L. et al, 2010. Ephrin-B3 binds to a sulfated cell-surface receptor. Biochem. J., 433, 215‑223.

Homaira N. et al, 2010. Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007. Epidemiol. Infect., 138, 1630‑1636.

Honke N. et al, 2012. Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. Nat. Immunol., 13, 51‑57.

Hooper P., Zaki S., Daniels P., Middleton D., 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. Microbes Infect. Inst. Pasteur, 3, 315‑322.

Hopkinson-Woolley J., Hughes D., Gordon S., Martin P., 1994. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. J. Cell Sci., 107 (Pt 5), 1159‑1167.

Horwood N.J., 2013. Immune cells and bone: coupling goes both ways. Immunol. Invest., 42, 532‑543.

Hosono H., Kono H., Ito S., Shirai J., 2006. T6-1.3.1 - Economic impact of nipah virus infection outbreak in Malaysia. Int. Symp. Vet. Epidemiol. Econ. ISVEE Proc., ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia, 324.

Hossain M.J. et al, 2008. Clinical Presentation of Nipah Virus Infection in Bangladesh. Clin. Infect. Dis., 46, 977‑984.

Hsu V.P. et al, 2004. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. Emerg. Infect. Dis., 10, 2082‑2087.

Hyatt A.D., Zaki S.R., Goldsmith C.S., Wise T.G., Hengstberger S.G., 2001. Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. Microbes Infect. Inst. Pasteur, 3, 297‑306.

Iannacone M. et al, 2010. Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. Nature, 465, 1079‑1083.

Iehle C. et al, 2007. Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. Emerg. Infect. Dis., 13, 159‑61.

Ireland D.D., Stohlman S.A., Hinton D.R., Atkinson R., Bergmann C.C., 2008. Type I interferons are essential in controlling neurotropic coronavirus infection irrespective of functional CD8 T cells. J. Virol., 82, 300‑10.

Jensen L.E., Whitehead A.S., 2003. ELAM-1/E-selectin promoter contains an inducible AP-1/CREB site and is not NF-kappa B-specific. BioTechniques, 35, 54‑56, 58.

Junt T. et al, 2007. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. Nature, 450, 110‑114.

Karger A., Schmidt U., Buchholz U.J., 2001. Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin. J. Gen. Virol., 82, 631‑40.

Kastenmüller W., Torabi-Parizi P., Subramanian N., Lämmermann T., Germain R.N., 2012. A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. Cell, 150, 1235‑1248.

Kawasaki N. et al, 2013. Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110, 7826‑7831.

Koenig A., Norgard-Sumnicht K., Linhardt R., Varki A., 1998. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. J. Clin. Invest., 101, 877‑89.

Kuka M., Iannacone M., 2014. The role of lymph node sinus macrophages in host defense. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1319, 38‑46.

Lam S.-K., 2003. Nipah virus--a potential agent of bioterrorism? Antiviral Res., 57, 113‑119.

Lancaster K.Z., Pfeiffer J.K., 2010. Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. PLoS Pathog., 6, e1000791‑e1000791.

Lee B., 2007. Envelope-receptor interactions in Nipah virus pathobiology. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1102, 51‑65.

Lee B., Ataman Z.A., 2011. Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. Trends Microbiol., 19, 389‑399.

Lee E., Pavy M., Young N., Freeman C., Lobigs M., 2006. Antiviral effect of the heparan sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. Antiviral Res., 69, 31‑38.

Liniger M. et al, 2008. Induction of neutralising antibodies and cellular immune responses against SARS coronavirus by recombinant measles viruses. Vaccine, 26, 2164‑74.

Lo M.K. et al, 2010. Characterization of the antiviral and inflammatory responses against Nipah virus in endothelial cells and neurons. Virology, 404, 78‑88.

Lo M.K. et al, 2009. Determination of the henipavirus phosphoprotein gene mRNA editing frequencies and detection of the C, V and W proteins of Nipah virus in virus-infected cells. J. Gen. Virol., 90, 398‑404.

Lo M.K. et al, 2012. Distinct and overlapping roles of Nipah virus P gene products in modulating the human endothelial cell antiviral response. PloS One, 7, e47790.

Luby S.P. et al, 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. Emerg. Infect. Dis., 12, 1888‑94.

Luby S.P., Gurley E.S., Hossain M.J., 2009. Transmission of human infection with Nipah Virus. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am., 49, 1743‑1748.

Mantovani Alberto, Sica Antonio, Locati M., 2005. Macrophage Polarization Comes of Age. Immunity, 23, 344‑346.
Marianneau P. et al, 2010. Experimental infection of squirrel monkeys with nipah virus. Emerg. Infect. Dis., 16, 507‑510.
Marsh G.A. et al, 2012. Cedar Virus: A Novel Henipavirus Isolated from Australian Bats. PLoS Pathog., 8, e1002836.
Martinez F.O., Gordon S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep., 6.
Martinez-Pomares L., Gordon S., 2012. CD169+ macrophages at the crossroads of antigen presentation. Trends Immunol., 33, 66‑70.
Mathieu C., Guillaume V., Sabine A., et al, 2012. Lethal Nipah virus infection induces rapid overexpression of CXCL10. PLoS ONE, 7, e32157.
Mathieu C. et al, 2011. Nipah Virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. J. Virol., 18.
Mathieu C., Guillaume V., Volchkova V.A., et al, 2012a. Nonstructural Nipah Virus C Protein Regulates both the Early Host Proinflammatory Response and Viral Virulence. J. Virol., 86, 10766‑10775.
Mathieu C., Guillaume V., Volchkova V.A., et al, 2012b. Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence. J. Virol.
Mayo M.A., 2002. Virus taxonomy - Houston 2002. Arch. Virol., 147, 1071‑1076.
McAllister C.S. et al, 2010. Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. J. Virol., 84, 380‑386.
Mcneil D.G.J., 2011. Bangladesh Bans Sale of Palm Sap After an Unusually Lethal Oubreak. N. Y. Times. Consultable : http://www.nytimes.com/2011/03/22/health/22global.html?partner=rss&emc=rss [Consulté le 22 mars 2011].
Middleton D.J. et al, 2002. Experimental Nipah Virus Infection in Pigs and Cats. J. Comp. Pathol., 126, 124‑136.
Middleton D.J. et al, 2007. Experimental Nipah Virus Infection in Pteropid Bats (Pteropus poliocephalus). J. Comp. Pathol., 136, 266‑272.
Mills J.N. et al, 2009. Nipah virus infection in dogs, Malaysia, 1999. Emerg. Infect. Dis., 15, 950‑952.
Mohd Nor M.N., Gan C.H., Ong B.L., 2000. Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot., 19, 160‑165.
Mondor I., Ugolini S., Sattentau Q.J., 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. J. Virol., 72, 3623‑34.
Montgomery J.M. et al, 2008. Risk Factors for Nipah Virus Encephalitis in Bangladesh. Emerg. Infect. Dis., 14, 1526‑1532.
Moseman E.A. et al, 2012. B cell maintenance of subcapsular sinus macrophages protects against a fatal viral infection independent of adaptive immunity. Immunity, 36, 415‑426.
Mrkic B. et al, 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. J. Virol., 72, 7420‑7.
Mungall B.A. et al, 2006. Feline Model of Acute Nipah Virus Infection and Protection with a Soluble Glycoprotein-Based Subunit Vaccine. J. Virol., 80, 12293‑12302.

Mungall B.A. et al, 2007. Vertical Transmission and Fetal Replication of Nipah Virus in an Experimentally Infected Cat. J. Infect. Dis., 196, 812‑816.
Munster V.J. et al, 2012. Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route. Sci. Rep., 2.
Murray K., Selleck P., et al, 1995. A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. Science, 268, 94‑7.
Murray K., Rogers R., et al, 1995. A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. Emerg. Infect. Dis., 1, 31‑33.
Nahar N., Sultana R., Gurley E.S., Hossain M.J., Luby S.P., 2010. Date palm sap collection: exploring opportunities to prevent Nipah transmission. Ecohealth, 7, 196‑203.
Nakka P., Amos G.J., Saad N., Jeavons S., 2012. MRI findings in acute Hendra virus meningoencephalitis. Clin. Radiol., 67, 420‑428.
Ben-Nathan D., Huitinga I., Lustig S., van Rooijen N., Kobiler D., 1996. West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice. Arch. Virol., 141, 459‑469.
Negrete O.A. et al, 2005. EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. Nature, 436, 401‑405.
Negrete O.A. et al, 2006. Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. PLoS Pathog., 2, e7.
Nossal G.J., Abbot A., Mitchell J., Lummus Z., 1968. Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. J. Exp. Med., 127, 277‑290.
Oeckinghaus A., Hayden M.S., Ghosh S., 2011. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. Nat. Immunol., 12, 695‑708.
Omi-Furutani M., Yoneda M., Fujita K., Ikeda F., Kai C., 2010. Novel Phosphoprotein-Interacting Region in Nipah Virus Nucleocapsid Protein and Its Involvement in Viral Replication. J. Virol., 84, 9793‑9799.
Ong S.T., Yusoff K., Kho C.L., Abdullah J.O., Tan W.S., 2009. Mutagenesis of the nucleocapsid protein of Nipah virus involved in capsid assembly. J. Gen. Virol., 90, 392‑397.
Organisation mondiale de la santé, 2005. Manuel de sécurité biologique en laboratoire. Genève, 3. ed.,
Pager C.T., Craft W.W. Jr, Patch J., Dutch R.E., 2006. A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. Virology, 346, 251‑257.
Pallister J. et al, 2011. A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. Vaccine, 29, 5623‑5630.
Park M.-S. et al, 2003. Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. J. Virol., 77, 1501‑1511.
Patch J.R., Crameri G., Wang L.F., Eaton B.T., Broder C.C., 2007. Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. Virol. J., 4, 1.
Paton N.I. et al, 1999. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. The Lancet, 354, 1253‑1256.
Peel A.J. et al, 2012. Henipavirus neutralising antibodies in an isolated island population of African fruit bats. PloS One, 7, e30346.

Petitou M., Casu B., Lindahl U., 2003. 1976-1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. Biochimie, 85, 83‑89.
Pfaff D. et al, 2008. Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. J. Cell Sci., 121, 3842‑3850.
Phan T.G., Green J.A., Gray E.E., Xu Y., Cyster J.G., 2009. Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation. Nat. Immunol., 10, 786‑793.
Pittet M.J., Nahrendorf M., Swirski F.K., 2014. The journey from stem cell to macrophage. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1319, 1‑18.
Playford E.G. et al, 2010. Human Hendra virus encephalitis associated with equine outbreak, Australia, 2008. Emerg. Infect. Dis., 16, 219‑223.
Porotto M. et al, 2010. Inhibition of Nipah Virus Infection In Vivo: Targeting an Early Stage of Paramyxovirus Fusion Activation during Viral Entry. PLoS Pathog., 6.
Porotto M., Yi F., Moscona A., LaVan D.A., 2011. Synthetic Protocells Interact with Viral Nanomachinery and Inactivate Pathogenic Human Virus. PLoS ONE, 6, e16874.
Premalatha G.D. et al, 2000. Assessment of Nipah virus transmission among pork sellers in Seremban, Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 31, 307‑309.
Pulliam J.R.C. et al, 2011. Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. J. R. Soc. Interface R. Soc.
Purtha W.E., Chachu K.A., Virgin H.W., Diamond M.S., 2008. Early B-Cell Activation after West Nile Virus Infection Requires Alpha/Beta Interferon but Not Antigen Receptor Signaling. J. Virol., 82, 10964‑10974.
Rahman M.A. et al, 2012. Date palm sap linked to nipah virus outbreak in bangladesh, 2008. Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N, 12, 65‑72.
Ranjbaran H. et al, 2006. Heparin displaces interferon-gamma-inducible chemokines (IP-10, I-TAC, and Mig) sequestered in the vasculature and inhibits the transendothelial migration and arterial recruitment of T cells. Circulation, 114, 1293‑1300.
Reynes J.-M. et al, 2005. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. Emerg. Infect. Dis., 11, 1042‑1047.
Richards K.F., Bienkowska-Haba M., Dasgupta J., Chen X.S., Sapp M., 2013. Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. J. Virol., 87, 11426‑37.
Ritchie K.J. et al, 2004. Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. Nat. Med., 10, 1374‑1378.
Rockx B. et al, 2010. A Novel Model of Lethal Hendra Virus Infection in African Green Monkeys and the Effectiveness of Ribavirin Treatment. J. Virol., 84, 9831‑9839.
Sahani M. et al, 2001. Nipah virus infection among abattoir workers in Malaysia, 1998-1999. Int. J. Epidemiol., 30, 1017‑1020.
Salah Uddin Khan M. et al, 2011. Use of Infrared Camera to Understand Bats' Access to Date Palm Sap: Implications for Preventing Nipah Virus Transmission. EcoHealth.
Salas A. et al, 2000. Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. Gut, 47, 88‑96.
Samuel M.A., Diamond M.S., 2005. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. J Virol, 79, 13350‑61.
Sarji S.A., Abdullah B.J., Goh K.J., Tan C.T., Wong K.T., 2000. MR imaging features of Nipah encephalitis. AJR Am. J. Roentgenol., 175, 437‑442.

Sasaki M. et al, 2012. Molecular detection of a novel paramyxovirus in fruit bats from Indonesia. Virol. J., 9, 240.
Schuhmann K.M., Pfaller C.K., Conzelmann K.-K., 2011. The Measles Virus V Protein Binds to p65 (RelA) To Suppress NF-κB Activity. J. Virol., 85, 3162‑3171.
Schulz C. et al, 2012. A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells. Science, 336, 86‑90.
Sejvar J.J. et al, 2007. Long-term neurological and functional outcome in Nipah virus infection. Ann. Neurol., 62, 235‑242.
Shaw M.L., Cardenas W.B., Zamarin D., Palese P., Basler C.F., 2005. Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. J. Virol., 79, 6078‑88.
Shaw M.L., Garcia-Sastre A., Palese P., Basler C.F., 2004. Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. J. Virol., 78, 5633‑41.
Shi C., Pamer E.G., 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol., 11, 762‑774.
Shieh M.T., Spear P.G., 1994. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. J. Virol., 68, 1224‑1228.
Stone R., 2011. Breaking the Chain in Bangladesh. Science, 331, 1128 ‑1131.
Tan C.T. et al, 2002. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. Ann. Neurol., 51, 703‑708.
Tan C.T., Wong K.T., 2003. Nipah encephalitis outbreak in Malaysia. Ann. Acad. Med. Singapore, 32, 112‑117.
Tanimura N., Imada T., Kashiwazaki Y., Sharifah S.H., 2006. Distribution of viral antigens and development of lesions in chicken embryos inoculated with nipah virus. J. Comp. Pathol., 135, 74‑82.
Terao-Muto Y. et al, 2008. Heparin-like glycosaminoglycans prevent the infection of measles virus in SLAM-negative cell lines. Antiviral Res., 80, 370‑6.
Torres-Velez F.J. et al, 2008. Histopathologic and immunohistochemical characterization of Nipah virus infection in the guinea pig. Vet. Pathol., 45, 576‑585.
Tsou C.-L. et al, 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. J. Clin. Invest., 117, 902‑909.
Urbinati C., Chiodelli P., Rusnati M., 2008. Polyanionic drugs and viral oncogenesis: a novel approach to control infection, tumor-associated inflammation and angiogenesis. Mol. Basel Switz., 13, 2758‑2785.
Vijayan M. et al, 2014. Sphingosine kinase 1 regulates measles virus replication. Virology, 450–451, 55‑63.
Virtue E.R., Marsh G.A., Wang L.-F., 2011. Interferon Signaling Remains Functional during Henipavirus Infection of Human Cell Lines. J. Virol., 85, 4031‑4034.
Vives R.R., Imberty A., Sattentau Q.J., Lortat-Jacob H., 2005. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. J. Biol. Chem., 280, 21353‑7.
Vives R.R., Lortat-Jacob H., Fender P., 2006. Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors : ally or foe? Curr. Gene Ther., 6, 35‑44.
Wacharapluesadee S. et al, 2010. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in Pteropus lylei bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N, 10, 183‑190.
Walpita P., Barr J., Sherman M., Basler C.F., Wang L., 2011. Vaccine Potential of Nipah Virus-Like Particles. PLoS ONE, 6, e18437.

Wang H.-H., Kung N.Y., Grant W.E., Scanlan J.C., Field H.E., 2013. Recrudescent infection supports Hendra virus persistence in Australian flying-fox populations. PloS One, 8, e80430.

Wang H.U., Chen Z.F., Anderson D.J., 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. Cell, 93, 741‑753.

Wang L. et al, 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. Microbes Infect. Inst. Pasteur, 3, 279‑287.

Wang Y.E. et al, 2010. Ubiquitin-Regulated Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the Nipah Virus Matrix Protein Is Important for Viral Budding. PLoS Pathog, 6.

Weingartl H. et al, 2005. Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus. J. Virol., 79, 7528‑7534.

Weingartl H.M. et al, 2006. Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. J. Virol., 80, 7929‑7938.

Weingartl H.M., Berhane Y., Czub M., 2009. Animal models of henipavirus infection: A review. Vet. J., 181, 211‑220.

Williamson M.M., Hooper P.T., Selleck P.W., Westbury H.A., Slocombe R.F., 2000. Experimental hendra virus infectionin pregnant guinea-pigs and fruit Bats (Pteropus poliocephalus). J. Comp. Pathol., 122, 201‑207.

Winkelmann E.R. et al, 2014. Subcapsular sinus macrophages limit dissemination of West Nile virus particles after inoculation but are not essential for the development of West Nile virus-specific T cell responses. Virology, 450-451, 278‑289.

Wong K.T. et al, 2003. A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. Am. J. Pathol., 163, 2127‑2137.

Wong K.T. et al, 2009. Human Hendra virus infection causes acute and relapsing encephalitis. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 35, 296‑305.

Wong K.T. et al, 2002a. Nipah Virus Infection. Am. J. Pathol., 161, 2153‑2167.

Wong K.T. et al, 2002b. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. Am. J. Pathol., 161, 2153‑2167.

Wu Z. et al, 2014. Novel Henipa-like Virus, Mojiang Paramyxovirus, in Rats, China, 2012. Emerg. Infect. Dis., 20.

Xu K. et al, 2013. Crystal Structure of the Hendra Virus Attachment G Glycoprotein Bound to a Potent Cross-Reactive Neutralizing Human Monoclonal Antibody. PLoS Pathog., 9, e1003684.

Yamaguchi M., Kitagawa Y., Zhou M., Itoh M., Gotoh B., 2014. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. FEBS Lett., 588, 28‑34.

Yang C.H. et al, 2000. IFNalpha/beta promotes cell survival by activating NF-kappa B. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 13631‑6.

Yob J.M. et al, 2001. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. Emerg. Infect. Dis., 7, 439‑441.

Yokota S.-I., Okabayashi T., Fujii N., 2011. Measles virus C protein suppresses gamma-activated factor formation and virus-induced cell growth arrest. Virology, 414, 74‑82.

Yona S. et al, 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity, 38, 79‑91.

Yoneda M. et al, 2006. Establishment of a Nipah virus rescue system. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103, 16508‑16513.

Yoneda M. et al, 2010. The Nonstructural Proteins of Nipah Virus Play a Key Role in Pathogenicity in Experimentally Infected Animals. PLoS ONE, 5, e12709.

Young P.L. et al, 1996. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. Emerg. Infect. Dis., 2, 239‐240.

Yu M. et al, 1998. Sequence analysis of the Hendra virus nucleoprotein gene: comparison with other members of the subfamily Paramyxovirinae. J. Gen. Virol., 79 (Pt 7), 1775‐1780.

Zhang G. et al, 2013. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. Science, 339, 456‐460.

Zhu Z. et al, 2008. Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody. J. Infect. Dis., 197, 846‐853.

Zhu Z. et al, 2006. Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. J. Virol., 80, 891‐899.

Zhu Z., Gershon M.D., Ambron R., Gabel C., Gershon A.A., 1995. Infection of cells by varicella zoster virus: inhibition of viral entry by mannose 6-phosphate and heparin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 3546‐50.

Zimmer M., Palmer A., Köhler J., Klein R., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. Nat. Cell Biol., 5, 869‐878.

Annexes

I. Annexe 1 : Article sur le virus Tioman en collaboration avec Pierre-Olivier Vidalain, Institut Pasteur, Paris

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

The V Protein of Tioman Virus Is Incapable of Blocking Type I Interferon Signaling in Human Cells

Grégory Caignard[1¤a], Marianne Lucas-Hourani[1], Kevin P. Dhondt[2], Jean-Louis Labernardière[1¤b], Thierry Petit[4], Yves Jacob[5], Branka Horvat[2,3], Frédéric Tangy[1]*, Pierre-Olivier Vidalain[1]*

1 Unité de Génomique Virale et Vaccination, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) URA-3015, Virology Department, Institut Pasteur, Paris, France, **2** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U758, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, **3** University of Lyon 1, Lyon, France, **4** Zoo de La Palmyre, Les Mathes, France, **5** Unité de Génétique, Papillomavirus et Cancer Humain, Virology Department, Institut Pasteur, Paris, France

Abstract

The capacity of a virus to cross species barriers is determined by the development of *bona fide* interactions with cellular components of new hosts, and in particular its ability to block IFN-α/β antiviral signaling. Tioman virus (TioV), a close relative of mumps virus (MuV), has been isolated in giant fruit bats in Southeast Asia. Nipah and Hendra viruses, which are present in the same bat colonies, are highly pathogenic in human. Despite serological evidences of close contacts between TioV and human populations, whether TioV is associated to some human pathology remains undetermined. Here we show that in contrast to the V protein of MuV, the V protein of TioV (TioV-V) hardly interacts with human STAT2, does not degrade STAT1, and cannot block IFN-α/β signaling in human cells. In contrast, TioV-V properly binds to human STAT3 and MDA5, and thus interferes with IL-6 signaling and IFN-β promoter induction in human cells. Because STAT2 binding was previously identified as a host restriction factor for some *Paramyxoviridae*, we established STAT2 sequence from giant fruit bats, and binding to TioV-V was tested. Surprisingly, TioV-V interaction with STAT2 from giant fruit bats is also extremely weak and barely detectable. Altogether, our observations question the capacity of TioV to appropriately control IFN-α/β signaling in both human and giant fruit bats that are considered as its natural host.

Citation: Caignard G, Lucas-Hourani M, Dhondt KP, Labernardière J-L, Petit T, et al. (2013) The V Protein of Tioman Virus Is Incapable of Blocking Type I Interferon Signaling in Human Cells. PLoS ONE 8(1): e53881. doi:10.1371/journal.pone.0053881

Editor: Bumsuk Hahm, University of Missouri-Columbia, United States of America

Received May 29, 2012; **Accepted** December 4, 2012; **Published** January 14, 2013

Copyright: © 2013 Caignard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: GC is supported by Fondation Recherche Medicale and Institut Carnot Pasteur-MI and KD is supported by DGA-INSERM. Work in BSL4 was supported by grants from INSERM and Agence Nationale de Recherche, Microbiologie, Immunologie et Maladies Emergentes (ANR MIME) to BH. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ftangy@pasteur.fr (FT); vidalain@pasteur.fr (POV)

¤a Current address: Department of Human Genetics, Centre for the Study of Host Resistance, McGill University, Montreal, Quebec, Canada
¤b Current address: BioAlliance Pharma, Paris, France

Introduction

Paramyxoviridae is a family of viruses with a negative-sense RNA genome that includes important human pathogens like measles virus (MeV), human parainfluenza virus type 3 (hPIV3), and human respiratory syncytial virus (hRSV) [1]. As demonstrated by phylogenic studies, these human pathogens emerged from zoonotic events that occurred hundreds or thousands of years ago [2]. Novel *Paramyxoviridae* have also emerged recently because of major ecological changes [3]. Deforestation in tropical areas has destroyed the natural habitat of fruit bat species, forcing them to live in the vicinity of human settlements. These close contacts are responsible, in Southeast Asia and Australia, for the emergence of highly pathogenic *Paramyxoviridae* in local human populations such as Nipah virus [4]. While searching for traces of this virus in urine samples from giant fruit bats of the *Pteropus* genus, Kaw Bing Chua and collaborators have isolated another previously unknown *Paramyxoviridae* from *Rubulavirus* genus that was named Tioman virus (TioV) [5]. Its negative-sense single-strand RNA genome encodes for six structural proteins that directly participate in viral replication and/or particle assembly. In addition, the P locus encodes for two non-structural proteins, V and W (Figure 1), which are considered as essential virulence factors by homology with other rubulaviruses like mumps virus (MuV). Some neutralizing antibodies against TioV have been found in serum samples from local inhabitants, suggesting close contacts with this virus [6]. Nevertheless, and despite its ability to infect human cells *in vitro* [5,7], whether TioV is associated to some human pathology remains undetermined. Furthermore, biochemical and functional properties of TioV proteins, in particular the two non-structural factors V and W, remain poorly characterized.

Paramyxoviridae V proteins are potent and multifunctional inhibitors of type I interferon (IFN-α/β) pathway, which is the core component of antiviral immune response in mammals [8,9]. First, *Paramyxoviridae* V proteins interact with two cellular proteins involved in cytoplasmic sensing of viral RNA molecules, MDA5 and LGP2, and thus impair IFN-α/β expression in infected cells [10,11,12,13]. In addition, *Paramyxoviridae* V proteins interfere with cell signaling downstream of IFN-α/β receptor, but each genus within the family exhibits specific mechanisms of inhibition [14]. For rubulaviruses, the molecular mechanism underlying the inhibition of IFN-α/β signaling has been well documented for parainfluenza virus type 5 (PIV5), mumps virus (MuV) and human parainfluenza virus type 2 (hPIV2). Once secreted, IFN-α/β bind to membrane receptor IFNAR1/IFNAR2c, and trigger the

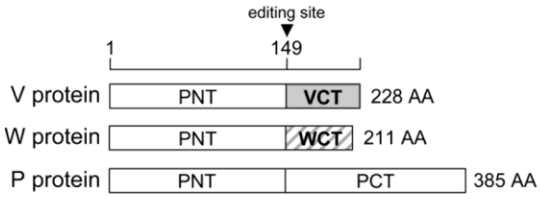


Figure 1. The gene P of TioV encodes for three proteins: V, W and P. Whereas conventional transcription and translation lead to the expression of TioV-V, co-transcriptional insertion of one G residue at the editing site by the viral RNA polymerase leads to the expression of a chimeric protein called W. Insertion of two G residues can also occur during transcription, thus leading to the expression of the phosphoprotein P.
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g001

activation of STAT1 and STAT2 transcription factors that together induce the expression of a large antiviral gene cluster. Rubulavirus V proteins inhibit this pathway by interacting and inducing STAT protein polyubiquitinylation and degradation through the recruitment of an E3 ubiquitin ligase complex composed of DDB1, Cul4A and Rbx/Roc1 subunits [15,16,17,18,19,20,21,22,23,24]. Interestingly, MuV and PIV5 V proteins require cellular STAT2 as an adaptor to recruit and eliminate STAT1. In contrast, hPIV2 V protein uses STAT1 as an adaptor to target STAT2 for degradation (although in some cases it can directly target STAT1 for degradation) [23,25,26,27]. MuV-V has also evolved a distinct binding interface to recruit directly STAT3 for ubiquitination and degradation [28,29], resulting in the inhibition of IL-6 signaling, another pathway involved in the host antiviral response. Alike MuV-V, the V protein of TioV (TioV-V) has been shown to bind MDA5 and LGP2, thus inhibiting IFN induction by viral RNA molecules [10,13]. However, whether TioV-V is also able to inhibit IFN-α/β signaling pathway by targeting STAT1/2 proteins for proteasomal degradation has not been addressed. Surprisingly, preliminary data obtained from a high-throughput functional screen that we previously performed suggested that the V protein of TioV is defective for the inhibition of IFN-α/β signaling [30]. This led us to study in further details TioV-V capacity to block this signaling pathway in human cells.

Results

TioV Infection Strongly Induces IFN Signaling in Human Cells

Previous studies have established the infection of human cells by TioV [5,7], but whether this induced IFN signaling required further investigations. We have recently established a HEK-293 cell line with a luciferase reporter gene under control of five IFN-stimulated response elements (ISRE). This reporter cell line was used to determine the activation of IFN signaling pathway in human cells upon TioV infection. In parallel, cells were infected with measles virus (MeV). Indeed, this virus encodes well-known virulence factors, including P, V and C proteins, which aim at controlling IFN signaling induction and antiviral response. The observation of cytopathic effects and formation of numerous syncytia at 48 h of culture confirmed cellular infection by TioV and MeV (Figure 2A). Although MeV-infected cells expressed moderate levels of luciferase, TioV infection was characterized by a strong induction of the ISRE-luciferase reporter gene at 48 h post-infection (Figure 2B), which reflects a potent activation of IFN signaling. This suggests that TioV is incapable of blocking IFN signaling, but also fails to control IFN production. Indeed, we found that UV-inactivated supernatant from TioV-infected HEK-293 cells strongly induced ISRE-luciferase expression when applied to fresh reporter cells, whereas supernatant from MeV-infected cells did not (Figure 2C). This is surprising since TioV-V protein expression was previously shown to block MDA5 and RIG-I signaling through interactions with MDA5 and LGP2, respectively [10,13]. However, many cellular components involved in viral sensing and IFN production are IFN-inducible. As a consequence, some defect in TioV-V capacity to block IFN signaling could translate into a robust expression of IFN at later time-points of the infection, thus explaining our results [31]. Altogether, these observations motivated the functional analysis of TioV-V protein and its interactions with the IFN signaling pathway.

The V protein of TioV is Incapable of Blocking IFN Signaling in Human Cells

TioV-V was first tested for its ability to block IFN-β signaling downstream of its receptor, and compared to MuV-V which is known to block this pathway through STAT2 binding and STAT1 targeting for proteasomal degradation. Plasmids encoding for MuV-V or TioV-V were co-transfected in HEK-293T human cells together with an ISRE-luciferase reporter plasmid, and stimulated after 24 hours with 200 IU/ml of recombinant IFN-β. TioV-V was unable to impair ISRE activation by IFN-β, whereas MuV-V efficiently inhibited signal transduction as expected (Figure 3A). To demonstrate that TioV-V is specifically defective for this function, we compared MuV-V and TioV-V for their ability to block IL-6 signaling by using a STAT3-dependent luciferase reporter gene. Although MuV-V was more efficient than TioV-V, both viral proteins impaired luciferase expression in IL-6 stimulated cells (Figure 3B). We also compared MuV-V and TioV-V for their capacity to block IFN-β promoter induction by MDA5 overexpression. As shown in Figure 3C, MuV-V and TioV-V equally inhibited this pathway in agreement with literature [10].

Altogether, these results demonstrate that both MuV-V and TioV-V inhibit MDA5-dependent IFN-β induction and IL-6 signaling in human cells whereas cell signaling downstream of IFN-α/β is only impaired by MuV-V. In addition to V, the P gene of TioV also encodes for the phosphoprotein P, which is part of the viral replication complex, and W of which function is undefined. Although a previous report showed that STAT1 can be only degraded by the full-length PIV5 V protein, excluding the involvement of the phosphoprotein P [16], we tested if TioV-P or TioV-W could substitute for TioV-V and block IFN-α/β signaling. However, neither TioV-P nor TioV-W inhibited ISRE activation when stimulating cells with recombinant IFN-β (Figure 3D). As a control, inhibition of IFN-α/β signaling was also determined when expressing viral proteins without a N-terminal 3xFLAG tag to verify that it did not interfere with their function (Figure 3E). Results obtained confirmed our previous conclusions, showing that known products of the P gene, and in particular TioV-V, were unable to block IFN-α/β signaling. Finally, and because TioV has been previously shown to induce type III interferons (IFN-λs) in primary bat splenocytes [32], we determined if TioV-V was capable of blocking this signaling pathway. Although type III interferons bind a specific membrane receptor called IFNLR1/IL10R2, which is distinct from IFN-α/β receptor (IFNAR1/IFNAR2c), these cytokines activate STAT1/2 phosphorylation and induce expression of ISRE-regulated genes alike IFN-α/β. In our reporter system, recombinant IFN-λ only induced a weak expression of the ISRE-luciferase gene, but this induction was blocked by MuV-V whereas TioV-V was unable to

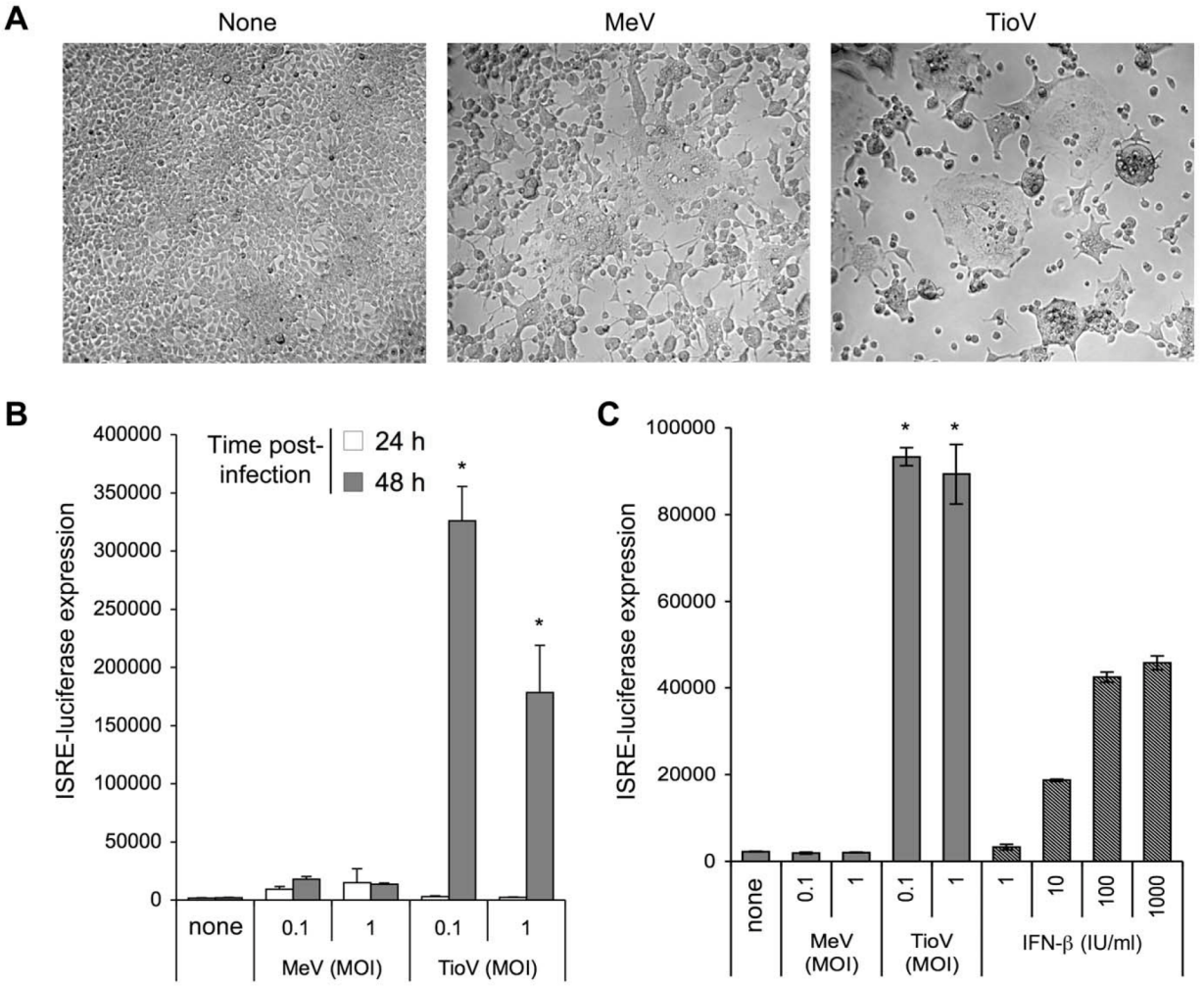


Figure 2. Activation of ISRE-dependent gene expression by MeV or TioV infection. HEK-293 cells stably transfected with an ISRE-luciferase reporter gene (STING-37 reporter cell line) were infected with MeV or TioV. (**A**) Bright field microscopy of cell cultures at 48 h post-infection (MOI = 1). (**B**) Luciferase expression was determined at 24 h and 48 h post-infection. (**C**) Culture supernatants from (B) were collected at 48 h post-infection, clarified by centrifugation, UV-inactivated and added to culture wells containing STING-37 cells. Alternatively, culture medium was supplemented with increasing doses of recombinant IFN-β. After 24 h, luciferase expression was determined. Luciferase activity in culture supernatants from (B) was below 1,400 luciferase activity units (data not shown). Experiment was performed in triplicates, and data represent means ± SD. *indicates that differences observed between MeV and TioV-infected cells were statistically significant (p-value <0.01).
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g002

do so (Figure 3F). This demonstrated that unlike MuV-V, TioV-V is incapable of targeting components of both IFN-α/β and IFN-λ signaling pathways.

To further demonstrate that TioV-V is unable to block IFN-α/β signaling in human cells, we quantified the induction of several IFN-inducible genes in cells expressing either MuV-V or TioV-V. HEK293-T cells were transfected with expression plasmids encoding for TioV-V, MuV-V, TioV-P or TioV-W, and then stimulated with IFN-β. Expression of eleven IFN-inducible genes, including IFI27, IFI35, IFI44, IFI6, IFIH1, IFIT1, IFIT3, IFITM1, ISG15, MX1, and OAS1, was determined by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 4, gene expression was strongly inhibited by MuV-V, whereas TioV-V, TioV-P or TioV-W had no effect. Altogether, we demonstrated that in contrast to MuV-V, TioV-V or known products of the P gene like TioV-P and TioV-W are unable to block IFN-α/β signaling in human cells. This suggested that TioV-V is deficient for targeting specific cellular proteins, in particular host factors involved in IFN-α/β signaling events.

TioV-V and MuV-V both Interact with Human MDA5, LGP2 and STAT3

The functional study described above was performed in parallel to a detailed analysis of TioV-V interaction profile with cellular proteins. First, TioV-V was used as bait in the yeast two-hybrid system to screen a human spleen cDNA library. The screen was performed at saturation with a 10-fold coverage of the library (50×10^6 diploids), and positive yeast colonies growing on selective medium were analyzed by PCR and sequencing to identify binding partners of TioV-V (data not shown). Using this protocol, we identified MDA5, LGP2 and STAT3 as direct interactors of TioV-V. The interactions with MDA5 and LGP2 were previously

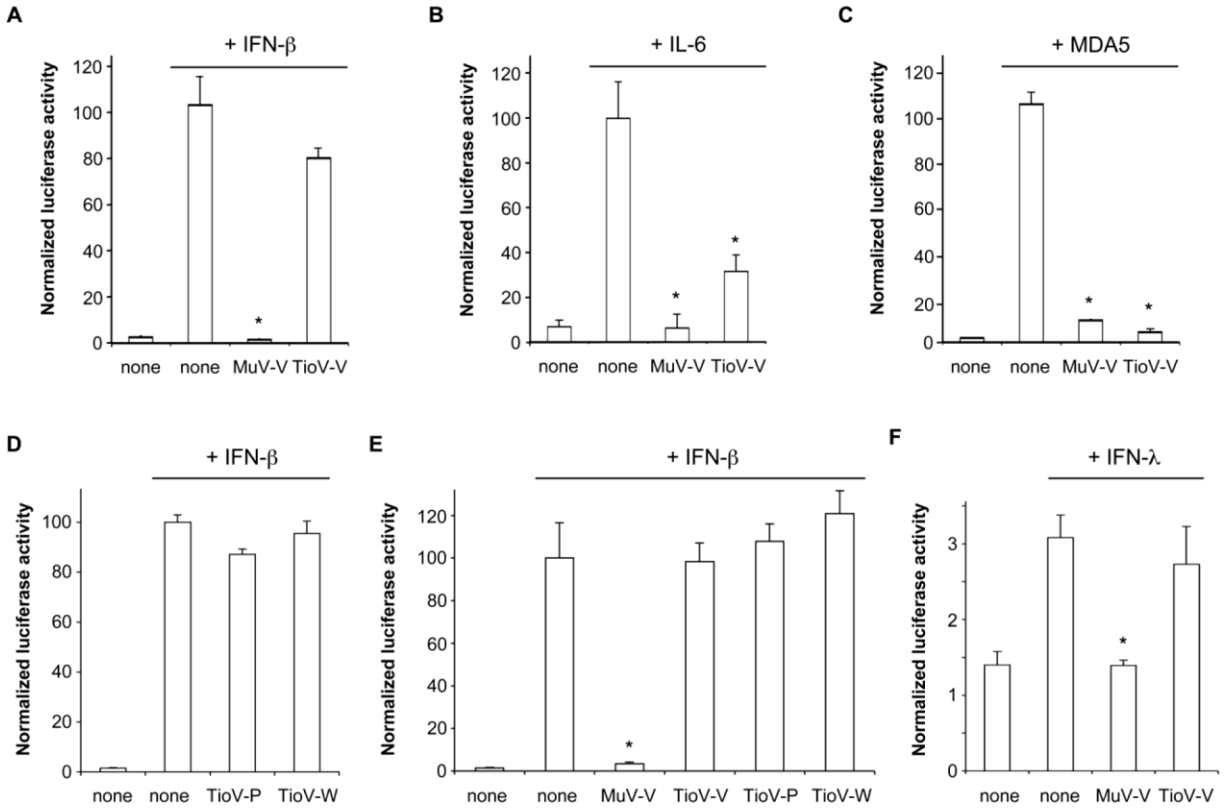


Figure 3. TioV-V inhibits IFN-β promoter activation by MDA5 and IL-6 signaling, but not IFN-α/β signaling. (**A**) HEK-293T cells were co-transfected with reporter plasmid pISRE-Luc (300 ng/well), pRL-CMV reference plasmid (30 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors encoding for 3xFLAG alone or fused to MuV-V or TioV-V (300 ng/well). After 24 h, recombinant IFN-β was added at 200 IU/ml. After an additional 24 h, relative luciferase activity was determined. (**B**) HEK-293T cells were co-transfected with reporter plasmid pSTAT3-Luc (300 ng/well), pRL-CMV (30 ng/well), and expression vectors encoding 3xFLAG-tagged MuV-V or TioV-V (300 ng/well). At 24 h post-transfection, recombinant IL-6 was added at 10 ng/ml. After an additional 24 h, relative luciferase activity was determined. (**C**) HEK-293T cells were co-transfected with IFN-β-pGL3 reporter plasmid (300 ng/well), pRL-CMV (30 ng/well), expression vectors encoding 3xFLAG-tagged MDA5 (300 ng/well) and MuV-V or TioV-V (300 ng/well). After 48 h, relative luciferase activity was determined. (**D**) Experiment was performed as in (A), but cells were co-transfected with expression vectors encoding 3xFLAG-tagged TioV-P or TioV-W. (**E**) Experiment was performed as in (A), but cells were co-transfected with pCI-neo expression vector, either empty or encoding untagged MuV-V, TioV-V, TioV-P or TioV-W. (**F**) Experiment was performed as in (A), but cells were stimulated with recombinant IFN-λ1 at 50 ng/ml. All experiments were performed in triplicates, and data represent means ± SD. *indicates that differences observed relative to controls (none) with IFN-β, IL-6, MDA5 or IFN-λ were statistically significant (p-value<0.01).
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g003

reported [10,13]. In contrast, STAT3 binding is new for TioV-V, although it was previously described for MuV [23,28,29]. To validate these interactions in human cells, GST-tagged TioV-V or MuV-V were co-expressed in HEK-293T cells with expression vectors encoding 3xFLAG-tagged MDA5, LGP2 or STAT3 and 48 h later, viral proteins were purified with glutathion-sepharose beads. MDA5, LGP2 and STAT3 co-purified with TioV-V protein, and results were equivalent to those observed with MuV-V (Figure 5A, B and C). To further establish the specificity of these interactions, we determined MDA5, LGP2 and STAT3 binding either to TioV-W, that shares its N-terminal region with TioV-V, or to the C-terminal VCT region that is specific of TioV-V. MDA5 and LGP2 only co-purified with TioV-V or the VCT region, thus demonstrating that the C-terminal region of TioV-V was sufficient to mediate these two interactions (Figure 5D and E). In contrast, STAT3 efficiently co-purified with TioV-V and some weak interaction was detected with TioV-W (Figure 5F). Thus, full-length TioV-V was required for a strong interaction with STAT3. Nevertheless, the weak interaction detected with TioV-W suggested that the N-terminal region is essential in agreement with a previous report showing that a single point mutation within the N-terminal region of MuV-V could prevent STAT3 binding [23,28,29]. Altogether, binding to MDA5 and STAT3 provide molecular basis to functional data presented in Figure 3B and 3C.

As Opposed to MuV-V, TioV-V does not Efficiently Bind STAT2, Fails to Induce STAT1 Degradation, and does not Impair STAT1 Nuclear Translocation in IFN-β-stimulated Cells

To block cell signaling downstream of IFN-α/β receptor, MuV-V relies on direct interactions with STAT2 and DDB1 to recruit and degrade STAT1 [15,16,17,18,20,21,22,23,24]. Since TioV-V is unable to impair IFN-α/β signaling in human cells, we tested its ability to interact with human DDB1 and STAT2. We also tested TioV-V interaction with STAT1. Indeed, we cannot exclude the possibility that TioV-V binds directly STAT1 rather than STAT2 alike the V protein of hPIV2. First, GST-tagged TioV-V or MuV-V were co-expressed in HEK-293T cells with 3xFLAG-tagged

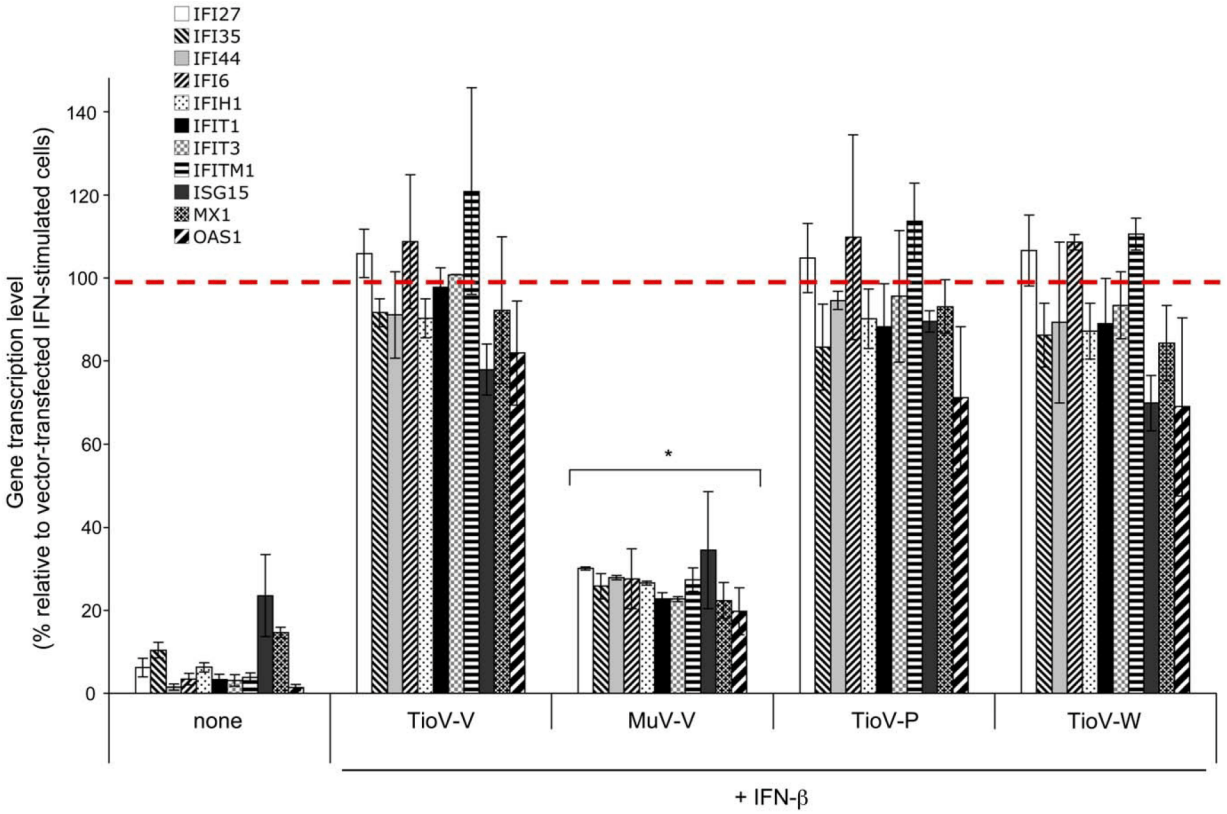


Figure 4. Expression of IFN-inducible genes is impaired by MuV-V but not TioV-V expression. HEK-293T cells were transfected with pCI-neo-3xFLAG expression vectors encoding for 3xFLAG alone or fused to TioV-V, MuV-V, TioV-P or TioV-W (500 ng/well). 24 h after transfection, cells were left unstimulated or stimulated with 200 IU/ml of recombinant IFN-β. After 24 h of culture, total RNAs were extracted, and expression levels of indicated genes were quantified by qRT-PCR. For each gene, data were normalized so that 100% corresponds to cells transfected with pCI-neo-3xFLAG empty vector and stimulated with recombinant IFN-β (dotted red line). Experiment was performed twice and data represent means ± SD. *indicates that differences observed with MuV-V relative to controls cells transfected with 3xFLAG alone and stimulated with IFN-β were statistically significant (p-value<0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g004

DDB1. After 48 h, viral proteins were purified with glutathion-sepharose beads, and 3xFLAG-tagged DDB1 was revealed by western-blot analysis. As shown in Figure 6A, human DDB1 interacted with MuV-V and TioV-V, suggesting that both viral proteins can recruit the E3 ubiquitin ligase machinery in human cells. To further establish the specificity of this interaction, we determined DDB1 binding either to TioV-W or TioV-VCT as described above. In agreement with structural data showing that DDB1 binding peptide is localized within the N-terminal region of PIV5-V [33,34], TioV-V and TioV-W but not TioV-VCT interacted with this cellular factor (Figure 6B).

Then, we tested TioV-V binding to human STAT2 and STAT1. GST-tagged TioV-V or MuV-V were co-expressed in HEK-293T cells with expression vectors encoding for 3xFLAG-tagged STAT2 or STAT1. After 48 h, viral proteins were purified with glutathion-sepharose beads, and 3xFLAG-tagged STAT2 or STAT1 were revealed by western-blot analysis. As shown in Figure 7A, TioV-V is severely affected for its capacity to bind STAT2 when compared to MuV-V. Furthermore, neither TioV-V nor MuV-V interacted with STAT1 whereas Nipah Virus V protein (NiV-V) was able to do so as expected (Figure 7B). We also determined if TioV-V could interact with STAT2 when STAT1 and STAT2 were co-expressed. TioV-V showed no interaction with STAT1 and some very limited binding to STAT2 as reported above, whereas no interaction was detected with the GST protein alone or a control protein corresponding to nsP4 from chikungunya virus (CHIKV) (Figure 7C). In contrast, MuV-V strongly interacted with STAT2 as expected. In agreement with literature, analysis of total cell lysates showed that MuV-V expression induced degradation of 3xFLAG-tagged STAT1 in this system. Interestingly, this degradation was strictly dependent on STAT2 co-expression (compare cell lysates in Figure 7B and 7C), thus corroborating reports showing that STAT1 degradation by MuV-V is dependent on STAT2 binding. In contrast, TioV-V expression showed no effect on STAT1 or STAT2 expression levels (Figure 7C). Finally, we determined if this interaction profile was modified when stimulating IFN signaling with recombinant IFN-β. As shown in Figure 7C, we did not observe any significant changes, except that MuV-V now co-purified minimal amounts of STAT1. This could be explained by the formation of stable phospho-dependent STAT1/STAT2 dimers that co-purified with MuV-V.

We then investigated the induction of STAT1 degradation and the binding of TioV-V or MuV-V to endogenous STAT2. HEK-293T cells were transfected with expression vectors encoding for 3xFLAG-tagged TioV-V, TioV-P, TioV-W or MuV-V, and

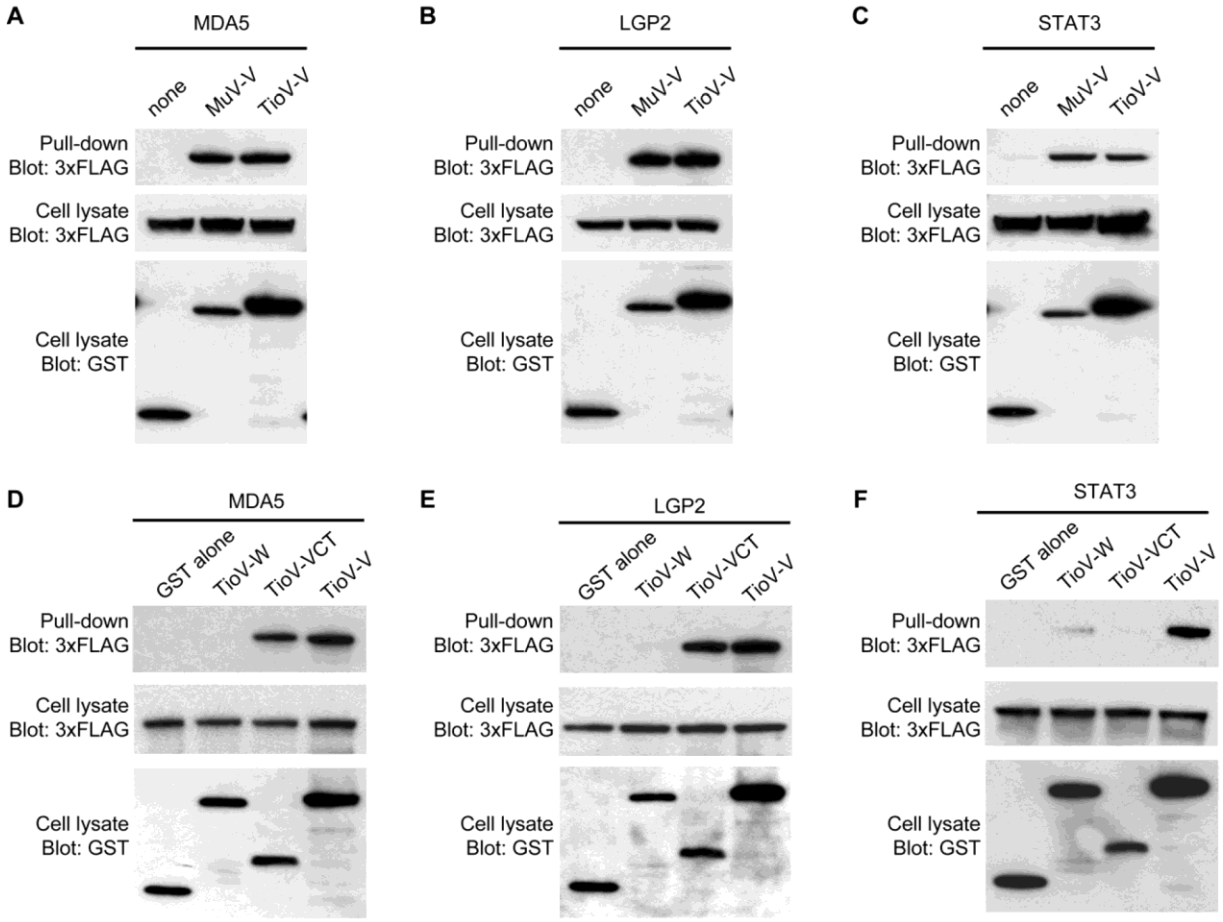


Figure 5. TioV-V binds MDA5, LGP2, and STAT3. (**A–C**) HEK-293T cells were co-transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to MuV-V (**A–C**), TioV-V (**A–F**), TioV-W (**D–F**) or TioV-VCT (**D–F**) (500 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors (300 ng/well) encoding for 3xFLAG-tagged human MDA5 (**A** and **D**), LGP2 (**B** and **E**), STAT3 (**C** and **F**). Total cell lysates from transfected cells were prepared at 48 h post-transfection (cell lysate; middle and lower panels), and protein complexes were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (GST pull-down; upper panel). 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected by immunoblotting.
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g005

endogenous STAT1 expression was determined by western-blot analysis at 48 h post-transfection. Results showed that MuV-V efficiently induced STAT1 degradation whereas TioV-V, alike TioV-P or TioV-W, had no effect (Figure 7D). To determine TioV-V binding to endogenous STAT2, HEK-293T cells were transfected with expression vectors encoding for 3xFLAG-tagged TioV-V, MuV-V or CHIKV-nsp4, and tagged viral proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies conjugated to sepharose beads. Endogenous STAT2 was found to co-immunoprecipitate with MuV-V but not TioV-V or control protein nsP4 (Figure 7E).

Finally, we determined if nuclear translocation of STAT1 upon IFN-β stimulation was impaired by TioV-V expression. To address this question, we built expression vectors encoding for Cherry protein alone or fused to TioV-V, MuV-V or NiV-V. We verified that that Cherry-tagged MuV-V and NiV-V inhibited ISRE-luciferase induction by recombinant IFN-β, whereas TioV-V was unable to do so (data not shown). Constructs were transfected in Vero cells and after 48 hours of culture, cells were stimulated for 30 min with IFN-β. Vero cells were used because, in contrast to HEK-293T cells, cytosplamic and nuclear compartments are clearly distinguished, and STAT1 subcellular localization is easily visualized by immunostaining and fluorescence microscopy. As shown in Figure 8, IFN-β induced STAT1 nuclear translocation in cells expressing either Cherry alone or fused to TioV-V. This experiment was also performed in HEK-293T and A549 cells, with the same result (data not shown). In contrast and as expected, Cherry-tagged MuV-V induced STAT1 degradation as assessed by the negative immunostaining, whereas Cherry-tagged NiV-V sequestered STAT1 in the cytoplasmic compartment [35,36]. Thus TioV-V is incapable of blocking STAT1 nuclear translocation in cells stimulated with IFN-β.

Altogether, this demonstrates that in contrast to MuV-V, TioV-V is incapable of interacting with STAT2 or STAT1, does not induce their degradation, and does not prevent STAT1 nuclear translocation upon IFN-β stimulation. These data provide molecular basis for the inability of TioV-V to block cell signaling downstream of IFN-α/β receptor in human cells.

TioV-V Hardly Interacts with STAT2 from Giant Fruit Bat

Although this is clearly not the only parameter involved, it has been previously shown that STAT2 binding is a host restriction

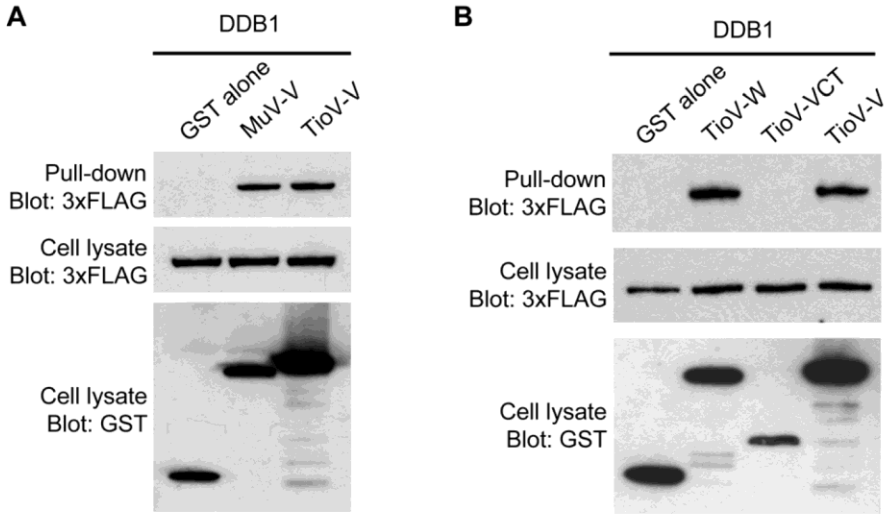


Figure 6. TioV-V binds DDB1. (A–B) HEK-293T cells were co-transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to MuV-V (**A**), TioV-V (**A–B**), TioV-W (**B**) or TioV-VCT (**B**) (500 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors (300 ng/well) encoding for 3xFLAG-tagged human DDB1 (**A–B**). Total cell lysates from transfected cells were prepared at 48 h post-transfection (cell lysate; middle and lower panels), and protein complexes were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (GST pull-down; upper panel). 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected by immunoblotting.
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g006

factor for parainfluenza virus 5 (PIV5), another *Paramyxoviridae* belonging to *Rubulavirus* genus. Indeed, the V protein of PIV5 efficiently binds STAT2 from human and other primates, but fails to interact with mouse STAT2 so that STAT1 degradation is not induced and IFN signaling is not blocked [37,38,39,40]. A recombinant PIV5 expressing a mutant V protein (N100D), which binds mouse STAT2 and blocks IFN signaling but is still unable to target STAT1 for degradation, better replicates in mouse cells [37,38,39]. However, this does not seem sufficient to provide a selective advantage *in vivo* [40]. In contrast, it has been shown that PIV5 replicates much better in mice transgenic for human STAT2, a model where both STAT2 binding and induction of STAT1 degradation by the V protein of PIV5 is restored [39]. Altogether, this illustrates the role of STAT2 binding as host restriction factor.

We thus hypothesized that TioV-V, which failed to bind human STAT2 (hereafter "hSTAT2"), could nevertheless interact with STAT2 from giant fruit bats of *Pteropus* genus. This question was particularly interesting because STAT2 sequence from giant fruit bats has never been established. TioV was originally isolated from *Pteropus hypomelanus*, and virus-specific antibodies were also found in *P. conspicillatus*, *P. rufus* as well as *Rousettus madagascariensis* [5,41,42]. Genomic sequence for *P. hypomelanus* has not been established yet, but we had the opportunity to access blood samples from closely related *P. rodricensis* since a large colony of this endangered species is maintained in a french zoo at La Palmyre (Charente-Maritime, France). From total RNA extracts, we were able to amplify, clone and establish the sequence of STAT2 from *P. rodricensis* ($_{Pr}$STAT2). A draft of *Pteropus vampyrus* genome has also been established by the Human Genome Sequencing Center, the Baylor College of Medicine and the Broad Institute, and is available on Ensembl database. A prediction for STAT2 sequence of this species is provided ($_{Pv}$STAT2; ENSPVAP00000007175), but required some improvements because sequencing coverage, accuracy, and gene structure annotation were imperfect. We used our data from *P. rodricensis* together with human and other mammalian sequences to correct and improve the current prediction for $_{Pv}$STAT2 (see Material and Methods).

As shown in Figure S1, $_{Pr}$STAT2 and $_{Pv}$STAT2 were almost identical, suggesting that STAT2 sequence is highly conserved among giant fruit bats of *Pteropus* genus. We thus tested the capacity of TioV-V to interact with $_{Pr}$STAT2. GST-tagged TioV-V or MuV-V were co-expressed with 3xFLAG-tagged hSTAT2 or prSTAT2 in HEK-293T cells, and then tested for their ability to interact by co-affinity purification (Figure 9). TioV-V interaction with hSTAT2 was extremely weak as previously shown in Figure 7A. Similar results were obtained when TioV-V interaction with $_{Pr}$STAT2 was tested. In contrast, MuV-V showed a strong capacity to bind hSTAT2, and a significant although weaker capacity to bind $_{Pr}$STAT2. This demonstrates that unlike MuV-V, TioV-V is unable to strongly interact with STAT2 from either human or giant fruit bats.

Discussion

We started this work showing that TioV infection activates IFN signaling in human HEK-293 cells. This suggested that TioV is incapable of blocking IFN signaling, but also fails to control IFN production. This appears surprising since TioV-V protein expression was previously shown to control IFN induction by MDA5 and RIG-I through interactions with MDA5 and LGP2, respectively [10,13]. Although this will need to be confirmed in TioV-infected cells, our data also validated TioV-V binding to MDA5 and LGP2, and its capacity to block IFN-β promoter induction upon MDA5 overexpression. Nevertheless, IFN secretion by TioV-infected cells could be explained by several non-exclusive mechanisms. First, inhibition of RIG-I signaling by V proteins form paramyxoviruses is dependent on LGP2 recruitment, and since levels of this co-factor are rate limiting in HEK-293 cells, TioV-infection could induce IFN expression because LGP2 is not sufficiently expressed in these cells [13]. It is also possible that TioV replication produces such high amounts of a specific viral PAMP, like defective-interfering RNA genomes, that

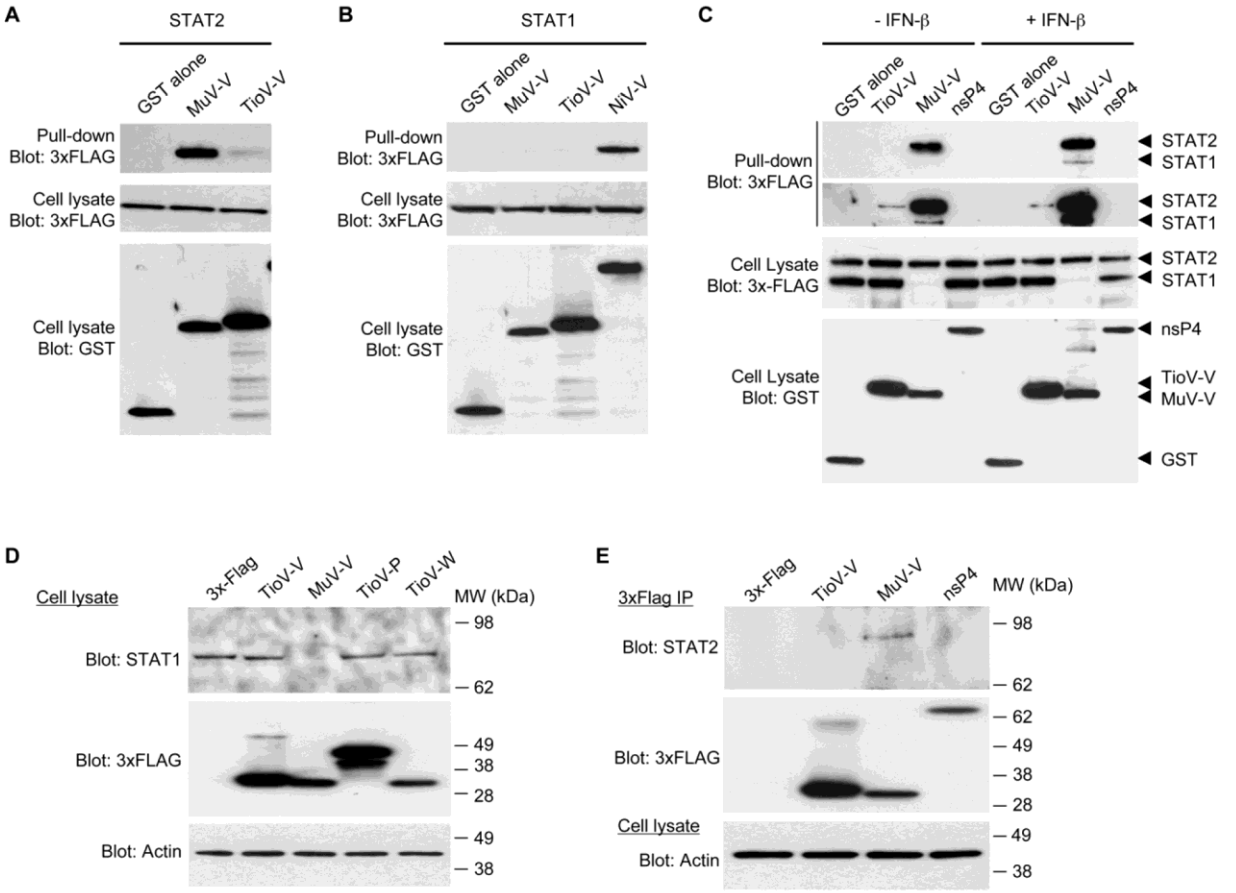


Figure 7. TioV-V fails to interact with human STAT2 and does not induce STAT1 degradation. (**A–B**) HEK-293T cells were co-transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to MuV-V, TioV-V (**A–B**) or NiV-V (**B**) (500 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors (300 ng/well) encoding for 3xFLAG-tagged human STAT2 (**A**) or STAT1 (**B**). Total cell lysates from transfected cells were prepared at 48 h post-transfection (cell lysate; middle and lower panels), and protein complexes were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (GST pull-down; upper panel). 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected by immunoblotting. (**C**) HEK-293T cells were co-transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to TioV-V, MuV-V or CHIKV-nsP4 (500 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors encoding for 3xFLAG-tagged human STAT1 and STAT2 (150 ng/well of each vector). At 24 h post-transfection, cells were left untreated or stimulated with recombinant IFN-β at 200 IU/ml. Total cell lysates from transfected cells were prepared at 48 h post-transfection (cell lysate; middle and lower panels), and protein complexes were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (GST pull-down; upper panels). 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected by immunoblotting. Upper and lower panels on top of figure C correspond to short and longer exposures of the same blot, respectively. (**D**) HEK-293T cells were transfected with pCI-neo-3xFLAG expression vector (1 μg/well) either empty or encoding for 3xFLAG-tagged TioV-V, MuV-V, TioV-P or TioV-W. Total cell lysates were prepared at 48 h post-transfection and endogenous STAT1 expression levels were determined by western-blot analysis. Actin expression was determined and used as a protein extraction and loading control. (**E**) HEK-293T cells were transfected with pCI-neo-3xFLAG expression vector (1 μg/well) either empty or encoding for 3xFLAG-tagged TioV-V, MuV-V or CHIKV-nsP4. Total cell lysates were prepared at 48 h post-transfection, and 3xFLAG-tagged viral proteins were purified using anti-FLAG antibodies conjugated to sepharose beads. Co-immunopurification of endogenous STAT2 with 3xFLAG-tagged viral proteins was determined by western-blot analysis (top and middle panel, respectively). Actin expression was determined prior to the immunoprecipitation on total cell lysates and used as a protein extraction control (lower panel).

doi:10.1371/journal.pone.0053881.g007

inhibition by TioV-V is ineffective. In addition, TioV could trigger IFN expression through viral sensors that are distinct from MDA5 and RIG-I. Finally, and since many cellular components involved in viral sensing are IFN-inducible, it is possible that small amounts of IFN produced at initial phases of the infection can translate into a robust expression of IFN-inducible genes at later time-points if IFN signaling is not blocked. This is supported by observations performed on PIV5 mutants (CPI- or rSV5-P/V-CPI-) expressing a V protein defective for STAT1 degradation and inhibition of IFN-α/β signaling, but competent for MDA5/LGP2 binding [43,44]. These mutants were found to induce some more (CPI-) or much more (rSV5-P/V-CPI-) IFN-α/β than the wild-type virus [45,46]. Since we now established that TioV-V is unable to block IFN signaling as well, this clearly parallels our observations on TioV.

Here, we demonstrate that in contrast to the V protein of MuV, TioV-V hardly interacts with human STAT2, does not induce STAT1 degradation and is unable to block signal transduction downstream of IFN-α/β and IFN-λ receptors. However, TioV-V remains functional regarding other known activities of rubulavirus V proteins, and besides interactions with MDA5 and LGP2, it was found to bind DDB1 and STAT3. This later interaction probably

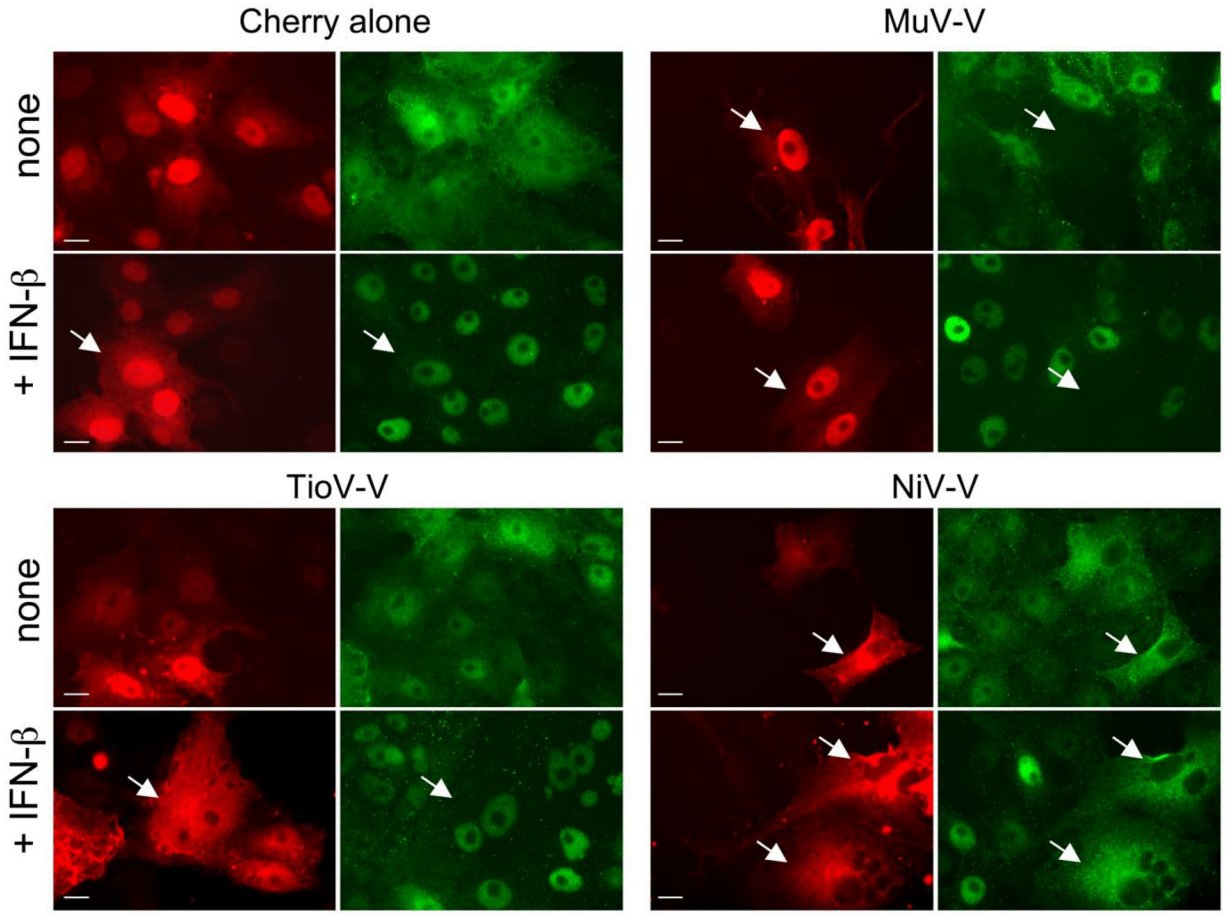


Figure 8. TioV-V does not inhibit STAT1 nuclear translocation induced by IFN-β. Vero cells were transfected with 100 ng of each plasmid encoding Cherry alone or fused to TioV-V, MuV-V or NiV-V. After 48 h of culture, cells were stimulated with IFN-β for 30 min, and STAT1 was labeled by immunostaining to determine its subcellular localization pattern. Green color corresponds to STAT1 whereas red corresponds to Cherry alone or Cherry-tagged viral proteins. Data show representative fields for each culture condition, and white arrows indicate cells expressing Cherry or Cherry-tagged viral proteins. Scale bar = 10 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g008

accounts for TioV-V capacity to block IL-6 signaling, although it was not as efficient as MuV-V to block this signaling pathway. Conformational constraints and/or a lack of adaptation to human STAT3 could explain the lower capacity of TioV-V to induce a functional complex targeting STAT3. In future, further investigations should establish that IL-6 signaling is actually impaired in TioV-infected cells.

The observation that TioV-V is unable to block IFN signaling in human cells is of interest to address ecological and epidemiological questions. Indeed, several viruses from *Paramyxoviridae* family originating from giant fruit bats have recently emerged in human populations in Southeast Asia and Australia, which include two members of *Henipavirus* genus, Hendra and Nipah viruses, and one rubulavirus closely related to Tioman virus called Menangle virus. The seroprevalence of henipaviruses (Nipah or Hendra virus) and rubulaviruses (Tioman or Menangle) in giant fruit bats can be very high (>50%) as assessed by a recent survey in Papua New Guinea [41]. Although Hendra virus has been responsible for limited outbreaks in Australian horse farms and few fatal human cases [47], Nipah virus has killed hundreds of people since 1999, while spreading from Malaysia to Singapore and Bengladesh [4]. Menangle virus also recently emerged from bats, causing disease outbreaks in Australian piggeries in 1997 with epidemiological evidence suggesting that it was responsible for severe flu-like syndromes in two piggery workers [48]. This illustrates the threat that bat *Paramyxoviridae* represent for human populations.

The V proteins of Nipah and Hendra viruses have been shown to block IFN-α/β signaling in several species including human [35,36]. Because the V protein is essential for rubulaviruses to inhibit IFN-α/β signaling [15,16,17,18,19,20,21,22,23,24], it is surprising that TioV-V is unable to block this pathway in human cells. Interestingly, the interaction with DDB1 suggests that at some point TioV-V was capable of targeting STAT1 proteins for proteasomal degradation but has lost this capacity during evolution. Alternatively, this interaction is maintained because TioV-V targets other cellular proteins for degradation. Nevertheless, the former hypothesis is further supported by the trace interaction detected between TioV-V and STAT2. In the future, the use of point mutants as well as MuV/TioV V chimeric proteins would be suitable to define amino acid residues in TioV-V and MuV-V that determine STAT2 binding and inhibition of IFN-α/β signaling cells. This would greatly help to establish that

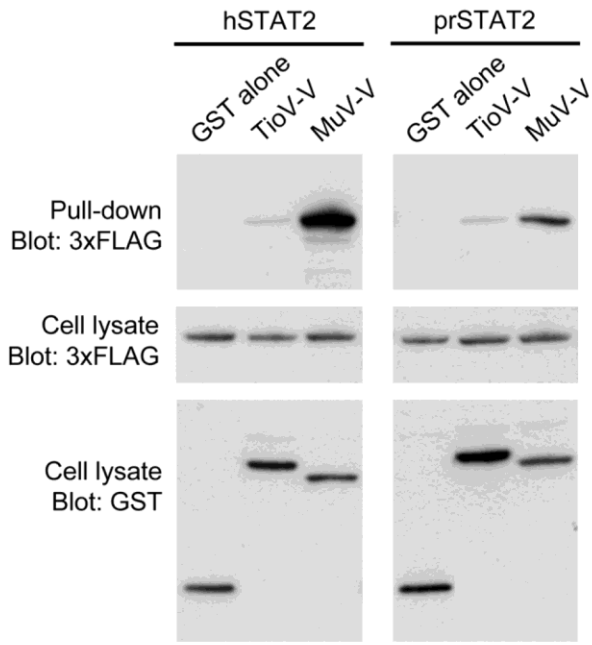


Figure 9. TioV-V fails to interact with $_{Pr}$STAT2. HEK-293T cells were co-transfected with expression vectors encoding GST alone or fused to TioV-V or MuV-V (500 ng/well), and pCI-neo-3xFLAG expression vectors (300 ng/well) encoding for 3xFLAG-tagged STAT2 from human (hSTAT2) or *Pteropus rodricensis* ($_{Pr}$STAT2). Total cell lysates from transfected cells were prepared 48 h post-transfection (cell lysate; middle and lower panels), and protein complexes were assayed by pull-down using glutathione-sepharose beads (GST pull-down; upper panel). 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected by immunoblotting.
doi:10.1371/journal.pone.0053881.g009

Tioman virus has indeed lost its capacity to efficiently bind STAT2 during evolution because of only few mutations. We also tested P and W proteins of TioV for the inhibition of IFN-α/β signaling, but none of these proteins exhibited such an activity when expressed in human cells. Although TioV could express yet unidentified viral factors to interfere with IFN-α/β signaling, *in vitro* infection experiments described in this report rather suggest some constitutive defect in the capacity of this virus to block IFN-α/β signaling in human cells.

Whether TioV is able to block IFN-α/β signaling in bats also remains a pending question. In this report, we established the sequence of STAT2 from *Pteropus rodricensis*, and then demonstrated that TioV-V is a poor binder of prSTAT2. Since this experiment was performed in human cells, it is possible that TioV-V and prSTAT2 failed to interact because bat-specific factors were missing in this microenvironment. It is also possible that TioV-V directly interacts with STAT1 from bats alike the V protein of hPIV2 [23,25,26,27]. In order to determine if TioV-V can block IFN-α/β signaling in bats, experiments must be performed in cells isolated from giant fruit bats of *Pteropus* genus. Unfortunately, no commercial cell line is currently available and only one lab in Australia has developed this kind of tool [49]. Using this system, Virtue and collaborators have shown that interferon production and signaling pathways are antagonized during henipavirus infection of fruit bat cell lines [50].

Altogether, our observations question the capacity of TioV to appropriately control IFN-α/β signaling in human and bat cells. Inhibition of IFN-α/β signaling may not be mandatory for TioV to be maintained in its natural host population and to infect human, regardless the induction of a specific pathology. Indeed, it has been reported that the V protein of human parainfluenza virus type 4 (hPIV4), a member of *Rubulavirus* genus infecting human, is unable to inhibit IFN-α/β signaling in host cells [51]. This natural defect could account for the fact that hPIV4 infection is less frequent and pathogenesis is less severe compared to other human paramyxoviruses [52]. Similarly, a human parainfluenza virus type 2 (hPIV2) with V protein mutations that prevented the virus from inhibiting IFN-mediated signaling maintained its capacity to replicate in the respiratory tract of non-human primates [53]. In both cases, the capacity to block IFN-α/β induction through interactions with MDA5 and LGP2 probably compensates to some point for the lack of inhibition downstream of IFN-α/β receptor and the same could be true for TioV *in vivo* [54]. However, the capacity of *Paramyxoviridae* to target STAT proteins has also been associated to their replication level in a specific host as aforementioned for PIV5 infection in mice [37,38,39], but also to the development of pathology. For example, a recombinant measles virus that is unable to fully antagonize IFN signaling cannot control inflammation and is attenuated in rhesus monkeys [55]. These data demonstrate that in some cases, the ability of *Paramyxoviridae* to block this antiviral pathway directly influences their infectivity, virulence and associated pathogenesis. Since our findings suggest that TioV is defective for the inhibition of IFN-α/β signaling at least in human cells, future studies should determine consequences in terms of infectivity, virulence and pathogenesis.

Materials and Methods

Cell Cultures and Tioman Virus Infection

All cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (FCS), penicillin, and streptomycin at 37°C and 5% CO2. Tioman virus derived from bat urine (TioV; kindly provided by Prof. S.K. Lam, University of Malaya, Malaysia) was produced on VERO-E6 cells, and titrated by plaque assay using the same cell line. Measles virus stock (MeV; strain Schwarz) was produced on VERO cells (ATCC), and titrated by TCID50 on HEK-293T cells (ATCC).

STING-37 cell line that corresponds to HEK-293 cells was stably transfected with an ISRE-luciferase reported gene, which will be described in details elsewhere (Lucas-Hourani M. & al., manuscript in preparation). Briefly, the ISRE-luciferase reporter gene was amplified by PCR from pISRE-luciferase reporter plasmid (Stratagene, Ref 219089), and inserted in a plasmid carrying a G418-resistance selection marker. This new plasmid was transfected in HEK-293 cells (ATCC) and two days later, culture medium was supplemented with G418 at 500 µg/ml. Transfected cells were amplified and subsequently cloned by serial limit dilution. A total of 44 clones were screened for luciferase expression, and STING-37 clone was selected for its optimal signal to background ratio when stimulated or not with recombinant IFN-β.

The stock of TioV used in this study was obtained in the BSL-4 "Jean Mérieux" (Lyon, France) in 2001, since the pathogenicity of this new virus was not known. Since then, the official classification has still not being made for this virus in France. According to current rules in the BSL-4 "Jean Mérieux", this stock of TioV cannot be taken out of the BSL-4 and consequently all experiments with live TioV were performed in these stringent conditions.

STING-37 cells were trypsinized and infected in suspension with a MOI of 1 or 0.1 at 37°C in DMEM either with TioV or

MeV. After 1 h of incubation, cells were centrifuged and the supernatant was removed. Cells were resuspended in DMEM +5% FCS and plated in 96-well plates. 48 h later, luciferase activity was determined by addition of 50 µl/well of Bright-GLO reagent (Promega) and measured during 0.1 s with a luminometer (Tecan).

Plasmid DNA Constructs

TioV-V (NP_665866), TioV-P (NP_665865), TioV-W (NP_665867), TioV-VCT (AA 150-228 of TioV-V), MuV-V (ABG48763, Mumps virus isolate "Sophie", GenBank accession number: DQ660370) and NiV-V (NP_112023.1) coding sequences were amplified by RT-PCR (Titan One tube; Roche) from RNA samples kindly provided by Dr. TF Wild, and cloned into pDONR207 (Invitrogen) using an *in vitro* recombination-based cloning system (Gateway system; Invitrogen) as previously described [30]. Chikungunya virus (CHIKV) nsP4 construct was previously described [30]. Corresponding constructs were stored in ViralORFeome database under reference IDs 493, 768, 842, 819, 217, 840 and 716 for MuV-V, TioV-V, TioV-P, TioV-W, TioV-VCT, NiV-V and CHIKV-nsP4, respectively. Compared to reference sequences in GenBank, TioV-P and TioV-W sequences from TioV strain used in this study showed amino acid mutations at positions N182S/A202V and M182V/R202W, respectively. Plasmids containing human STAT1 and STAT2 were previously described [56] whereas MDA5, LGP2, STAT3, and DDB1 coding sequences were amplified by PCR from a human spleen cDNA library (Invitrogen) before cloning into pDONR207 (Invitrogen). Subsequently, viral or cellular ORFs were transferred by an *in vitro* recombination from pDONR207 in different Gateway-compatible destination vectors (see below) following manufacturer's recommendation (LR cloning reaction, Invitrogen). To perform yeast two-hybrid experiments, TioV-V viral ORF was transferred into pDEST32 (Invitrogen) to be expressed in fusion downstream of the DNA binding domain of Gal4 (Gal4-DB). In mammalian cells, GST-tag and 3xFLAG-tag fusions were achieved using pDEST27 (Invitrogen) or pCI-neo-3xFLAG vector, respectively [57]. Expression of untagged proteins was achieved using a modified pCI-neo vector (Promega) compatible with the Gateway system (kindly provided by Dr. Yves Jacob).

DNA fragment encoding for $_{Pr}$STAT2 was generated from total RNA purified from *Pteropus rodricensis* blood. Samples were obtained as part of a routine medical check up performed on animals of a bat colony maintained in La Palmyre zoo. Blood samples were collected by the veterinarian in charge following appropriate guidelines to minimize animal stress and suffering. Bats were anesthetized prior to be handled using a mask with isoflurane at 5% for induction and at 3% for maintenance. Blood was taken from the median vein with a 23G needle. Total RNA were purified using the RNeasy Protect Animal Blood Kit (Qiagen), transcribed into cDNA by RT-PCR, and then cloned in pDONR207 vector. Once established and deposited in GenBank (ID: JQ846265), $_{Pr}$STAT2 sequence was aligned and compared to $_{Pv}$STAT2 (Figure S1) sequence prediction available on Ensembl database (ENSPVAP00000007175). Two peptides of $_{Pr}$STAT2 were absent from $_{Pv}$STAT2: LIWDFSYL (AA 398-405) and ELKLEPILGP (AA 778-787). Furthermore, PL and NL residues of $_{Pr}$STAT2 (AA 754-755 and 774-775) were respectively replaced by a single T and DQ in $_{Pv}$STAT2. All these discrepancies were cleared when Ensembl splicing model for $_{Pv}$STAT2 sequence was manually curated for intron-exon junctions. Besides, four amino acid residues from $_{Pr}$STAT2 were either absent (P and G at positions 13 and 850, respectively) or different (P, E, P and P at positions 28, 837, 843 and 854, respectively) in $_{Pv}$STAT2 sequence. However, all six residues are mostly if not totally conserved in human and other mammals thus suggesting that differences between $_{Pr}$STAT2 and $_{Pv}$STAT2 correspond to sequencing errors in $_{Pv}$STAT2 due to the low sequencing coverage of this genome. Finally, only one amino acid substitution (A183V) likely corresponds to a genuine difference between $_{Pr}$STAT2 and $_{Pv}$STAT2 sequences.

Luciferase Reporter Gene Assay

HEK-293T cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well). One day later, cells were transfected with either IFN-β-pGL3 (0.3 µg/well; [58]) or pISRE-Luc (0.3 µg/well; Stratagene) or pSTAT3-Luc plasmids (0.3 µg/well; SABiosciences) together with pRL-CMV reference plasmid (0.03 µg/well; Promega). Cells were simultaneously co-transfected with 0.3 µg/well of pCI-neo-3xFLAG expression vectors encoding 3xFLAG alone or fused to indicated proteins. Alternatively, cells were co-transfected with 0.3 µg/well of pCI-neo expression vectors encoding indicated proteins without any tag. Transfections were performed with either Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or JetPrime PEI (Polyplus transfection). 24 h after transfection, cells were stimulated with IFN-β (Biosource) at 200 IU/ml, 10 ng/ml of recombinant IL-6 (Miltenyi Biotech) or IFN-λ1 at 50 ng/ml (Acris). 24 h later, cells were lysed, and both firefly and Renilla luciferase activities in the lysates were determined using the Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega). Reporter activity was calculated as the ratio of firefly luciferase activity to reference Renilla luciferase activity.

Quantitative RT-PCR Analysis

HEK-293T cells were plated in 24-well plates (2×10^5 cells per well). One day later, cells were transfected with 0.5 µg/well of pCI-neo-3xFLAG expression vectors encoding 3xFLAG alone or fused to indicated proteins. Transfections were performed with JetPrime PEI (Polyplus transfection). 24 h after transfection, cells were stimulated with IFN-β (Biosource) at 200 IU/ml. 24 h later, cells were recovered in PBS and total RNA isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Following elution, RNA yields were evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop technologies).

A two-step qRT-PCR (Taqman technology, Applied Biosystems) was performed to measure transcription levels for 11 genes of interest (primer references are indicated between brackets): IFI27 (Hs00271467_m1), IFI35 (Hs00413458_m1), IFI44 (Hs00197427_m1), IFI6 (Hs00242571_m1), IFIH1 (Hs01070332_m1), IFIT1 (Hs01911452_s1), IFIT3 (Hs01922752_s1), IFITM1 (Hs00705137_s1), ISG15 (Hs01921425_s1), MX1 (Hs00895608_m1) and OAS1 (Hs00973637_m1). Expression levels of four housekeeping genes, including 18S (Hs99999901_s1), GAPDH (Hs99999905_m1), HPRT1 (Hs99999909_m1) and GUSB (Hs99999908_m1), were also determined and used as an internal reference controls. Starting from 1 µg of total RNA, cDNA synthesis was achieved in 20 µL using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit following manufacturer's recommendations (Life Technologies). Quantitative PCR reactions were performed on 0.6 µL of cDNA synthesis reaction mix using the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) on a StepOnePlus™ Real-Time PCR machine (Applied Biosystems). Results were normalized using expression levels of the four housekeeping genes.

Yeast Two-hybrid Screening Procedure

Our yeast two-hybrid protocol has been described in details elsewhere [59]. Briefly, pDEST32 plasmid encoding Gal4-DB fused to TioV-V was transformed in AH109 yeast strain (Clontech), and used to screen by mating a human spleen cDNA

library cloned in the Gal4-AD pPC86 vector (Invitrogen) and previously established in Y187 yeast strain (Clontech). Yeast cells were plated on a selective medium lacking histidine and supplemented with 80 mM 3-amino-triazole (3-AT; Sigma-Aldrich) to select for interaction-dependent transactivation of HIS3 reporter gene. AD-cDNAs from [His+] colonies were amplified by PCR and sequenced to identify the host proteins interacting with TioV-V.

Co-affinity Purification Experiments and Western Blot Analysis

To perform co-affinity purification experiments, cloned ORFs were transferred from pDONR207 to pDEST27 expression vector (Invitrogen) to achieve GST fusion, and to pCI-neo-3xFLAG vector for 3xFLAG fusion. Then, tagged proteins were expressed by transient transfection in HEK-293T cells. Briefly, 5×10^5 HEK-293T cells were dispensed in each well of a 6-well plate, and transfected 24 h later with 500 ng of each pDEST27 plasmid encoding viral ORFs and 300 ng of pCI-neo-3xFLAG vector containing 3xFLAG-tagged indicated proteins. Two days after transfection, HEK-293T cells were washed in PBS, then resuspended in lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 20 mM Tris–HCl at pH 8, 120 mM NaCl and 1 mM EDTA) supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cell lysates were incubated on ice for 20 min, then clarified by centrifugation at 14,000×g for 10 min. For pull-down analysis, 400 µg of protein extracts were incubated for 1 h at 4°C with 25 µl of glutathione-sepharose beads (Amersham Biosciences) to purify GST-tagged proteins. Beads were then washed 3 times in ice-cold lysis buffer and proteins were recovered by boiling in denaturing loading buffer (Invitrogen). Purified complexes and protein extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4–12% NuPAGE Bis–Tris gels with MOPS running buffer (Invitrogen), and transferred to a nitrocellulose membrane. Proteins were detected using standard immunoblotting techniques. 3xFLAG- and GST-tagged proteins were detected with a mouse monoclonal HRP-conjugated anti-3xFLAG antibody (M2; Sigma-Aldrich) and a rabbit polyclonal anti-GST antibody (Sigma-Aldrich), respectively.

Detection of Endogenous STAT Proteins and co-immunoprecipitation Experiment

HEK-293T cells were plated in 6-well plates at 5×10^5 cells per well, and transfected 24 h later with 1 µg of pCI-neo-3xFLAG expression vector encoding viral ORFs. Two days after transfection, HEK-293T cells were washed in PBS, then resuspended in lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 20 mM Tris–HCl at pH 8, 120 mM NaCl and 1 mM EDTA) supplemented with Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cell lysates were incubated on ice for 20 min, then clarified by centrifugation at 14,000×g for 10 min, and analyzed by Western-blot for STAT1 expression using an anti-STAT1 monoclonal antibody at a 1:1000 dilution (Clone 1, BD Biosciences). To control for protein extraction, β-actin expression was determined in parallel on the same samples using an anti-actin monoclonal antibody (Clone AC-15, Sigma-Aldrich).

For co-immunoprecipiation experiments, 400 µg of protein extracts were incubated for 1 h at 4°C with 20 µl of sepharose beads conjugated to M2 anti-3xFLAG monoclonal antibody (EZview Red anti-FLAG M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) to purify 3xFLAG-tagged viral proteins. Beads were then washed 3 times in ice-cold lysis buffer and proteins were recovered by boiling in denaturing loading buffer (Invitrogen). Purified complexes and protein extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4–12% NuPAGE Bis–Tris gels with MOPS running buffer (Invitrogen), and transferred to a nitrocellulose membrane. Endogenous STAT2 protein expression was determined by immunoblotting using an anti-STAT2 monoclonal antibody at a 1:250 dilution (Clone 22, BD Biosciences). To control for protein extraction, β-actin expression was determined in parallel on total cell lysates using an anti-actin monoclonal antibody (Clone AC-15, Sigma-Aldrich).

STAT1 Immunostaining and Subcellular Localization

To perform subcellular localization experiments, cloned ORFs were transferred from pDONR207 to pmCherry-C1 expression vector (Clontech) made compatible with Gateway system to achieve Cherry fusion. Vero cells were plated in poly-L-lysine µ-slide 8 well (Ibidi) at 10^4 cells/well. After 24 h, cells were transfected with 100 ng of each plasmid using Lipofectamine 2000 following manufacturer's recommendations (Invitrogen). After 48 h, cells were incubated with 500 IU/ml of IFN-β for 30 min at 37°C. Cells were fixed with PFA 3.2% for 20 min, washed and permeabilized with PBS+0.05% Triton for 5 min at room temperature. Cells were incubated overnight at 4°C with PBS+5% goat serum. Immunostaining was performed for 1 h with mouse anti-STAT1 monoclonal antibody 9H2 (Cell Signaling) diluted in PBS +5% goat serum at 1:100. Cells were washed and stained with anti-mouse Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody (Invitrogen). Finally, cells were stained DAPI for 5 min, washed and aqueous mounting medium was added (Fluoromount, Sigma-Aldrich). Slides were analyzed with a fluorescence microscope (Leica DM/IRB) using oil immersion and a 40× objective.

Supporting Information

Figure S1 Analysis of STAT2 sequences from giant fruit bats in comparison with other mammals. (**A**) Amino acid sequences from $_{Pr}$STAT2 (established in this study) and $_{Pv}$STAT2 (both before and after editing; ★indicates specific positions discussed in the Material and Methods section) have been aligned to human, panda, ferret, dog, horse, pig and cow orthologous sequences. Alignment was performed using CLC Workbench 4.0.1. Mismatch and gaps are indicated by red gradation.
(PDF)

Acknowledgments

We would like to thank Prof. S.K. Lam for providing TioV, and Dr. TF. Wild for RNA samples from TioV and MuV infected cells. We thank all members of PF1-Pasteur Genopole sequencing core facility. We thank members of the Infection-MAPping project I-MAP for fruitful discussions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GC POV BH FT. Performed the experiments: GC MLH JLL KPD POV. Analyzed the data: GC MLH JLL FT KPD BH POV. Contributed reagents/materials/analysis tools: TP YJ. Wrote the paper: GC FT BH KPD POV.

References

1. Lamb RA, Parks GD (2007) *Paramyxoviridae*: the viruses and their replication. In: David M. Knipe PMH, editor. Fields Virology, 5th ed: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 1449–1496.
2. Brussow H (2009) Europe, the bull and the Minotaur: the biological legacy of a Neolithic love story. Environ Microbiol 11: 2778–2788.
3. Wild TF (2009) Henipaviruses: a new family of emerging Paramyxoviruses. Pathol Biol (Paris) 57: 188–196.
4. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, et al. (2000) Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. Science 288: 1432–1435.
5. Chua KB, Wang LF, Lam SK, Crameri G, Yu M, et al. (2001) Tioman virus, a novel paramyxovirus isolated from fruit bats in Malaysia. Virology 283: 215–229.
6. Yaiw KC, Crameri G, Wang L, Chong HT, Chua KB, et al. (2007) Serological evidence of possible human infection with Tioman virus, a newly described paramyxovirus of bat origin. Journal of Infectious Diseases 196: 884–886.
7. Yaiw KC, Hyatt A, VanDriel R, Crameri SG, Eaton B, et al. (2008) Viral morphogenesis and morphological changes in human neuronal cells following Tioman and Menangle virus infection. Archives of Virology 153: 865–875.
8. Stetson DB, Medzhitov R (2006) Type I interferons in host defense. Immunity 25: 373–381.
9. van Boxel-Dezaire AHH, Rani MRS, Stark GR (2006) Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I Interferons. Immunity 25: 361–372.
10. Childs K, Stock N, Ross C, Andrejeva J, Hilton L, et al. (2007) mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. Virology 359: 190–200.
11. Childs KS, Andrejeva J, Randall RE, Goodbourn S (2009) Mechanism of mda-5 Inhibition by Paramyxovirus V Proteins. Journal of Virology 83: 1465–1473.
12. Parisien JP, Bamming D, Komuro A, Ramachandran A, Rodriguez JJ, et al. (2009) A Shared Interface Mediates Paramyxovirus Interference with Antiviral RNA Helicases MDA5 and LGP2. Journal of Virology 83: 7252–7260.
13. Childs K, Randall R, Goodbourn S (2012) Paramyxovirus V Proteins Interact with the RNA Helicase LGP2 To Inhibit RIG-I-Dependent Interferon Induction. Journal of Virology 86: 3411–3421.
14. Ramachandran A, Horvath CM (2009) Paramyxovirus disruption of interferon signal transduction: STATus report. J Interferon Cytokine Res 29: 531–537.
15. Lin GY, Paterson RG, Richardson CD, Lamb RA (1998) The V protein of the paramyxovirus SV5 interacts with damage-specific DNA binding protein. Virology 249: 189–200.
16. Didcock L, Young DF, Goodbourn S, Randall RE (1999) The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. Journal of Virology 73: 9928–9933.
17. Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N (2001) C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT 1-alpha. Biochem Biophys Res Commun 283: 255–259.
18. Andrejeva J, Poole E, Young DF, Goodbourn S, Randall RE (2002) The p127 subunit (DDB1) of the UV-DNA damage repair binding protein is essential for the targeted degradation of STAT1 by the V protein of the paramyxovirus simian virus 5. Journal of Virology 76: 11379–11386.
19. Nishio M, Garcin D, Simonet V, Kolakofsky D (2002) The carboxyl segment of the mumps virus V protein associates with Stat proteins in vitro via a tryptophan-rich motif. Virology 300: 92–99.
20. Yokosawa N, Yokota S, Kubota T, Fujii N (2002) C-terminal region of STAT-1alpha is not necessary for its ubiquitination and degradation caused by mumps virus V protein. Journal of Virology 76: 12683–12690.
21. Ulane CM, Horvath CM (2002) Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. Virology 304: 160–166.
22. Precious B, Childs K, Fitzpatrick-Swallow V, Goodbourn S, Randall RE (2005) Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1. Journal of Virology 79: 13434–13441.
23. Ulane CM, Kentsis A, Cruz CD, Parisien JP, Schneider KL, et al. (2005) Composition and assembly of STAT-targeting ubiquitin ligase complexes: Paramyxovirus V protein carboxyl terminus is an oligomerization domain. Journal of Virology 79: 10180–10189.
24. Precious BL, Carlos TS, Goodbourn S, Randall RE (2007) Catalytic turnover of STAT1 allows PIV5 to dismantle the interferon-induced anti-viral state of cells. Virology 368: 114–121.
25. Young DF, Didcock L, Goodbourn S, Randall RE (2000) Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response. Virology 269: 383–390.
26. Parisien JP, Lau JF, Rodriguez JJ, Sullivan BM, Moscona A, et al. (2001) The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. Virology 283: 230–239.
27. Parisien JP, Lau JF, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM (2002) Selective STAT protein degradation induced by paramyxoviruses requires both STAT1 and STAT2 but is independent of alpha/beta interferon signal transduction. Journal of Virology 76: 4190–4198.
28. Ulane CM, Rodriguez JJ, Parisien JP, Horvath CM (2003) STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. Journal of Virology 77: 6385–6393.
29. Puri M, Lemon K, Duprex WP, Rima BK, Horvath CM (2009) A point mutation, E95D, in the mumps virus V protein disengages STAT3 targeting from STAT1 targeting. Journal of Virology 83: 6347–6356.
30. Pellet J, Tafforeau L, Lucas-Hourani M, Navratil V, Meyniel L, et al. (2010) ViralORFeome: an integrated database to generate a versatile collection of viral ORFs. Nucleic Acids Res 38: D371–378.
31. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Sato M, Ozato K, et al. (1996) Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). J Biochem 120: 160–169.
32. Zhou P, Cowled C, Todd S, Crameri G, Virtue ER, et al. (2011) Type III IFNs in pteropid bats: differential expression patterns provide evidence for distinct roles in antiviral immunity. J Immunol 186: 3138–3147.
33. Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, et al. (2006) Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. Nature 443: 590–593.
34. Li T, Chen X, Garbutt KC, Zhou P, Zheng N (2006) Structure of DDB1 in complex with a paramyxovirus V protein: viral hijack of a propeller cluster in ubiquitin ligase. Cell 124: 105–117.
35. Hagmaier K, Stock N, Goodbourn S, Wang LF, Randall R (2006) A single amino acid substitution in the V protein of Nipah virus alters its ability to block interferon signalling in cells from different species. J Gen Virol 87: 3649–3653.
36. Rodriguez JJ, Wang LF, Horvath CM (2003) Hendra virus V protein inhibits interferon signaling by preventing STAT1 and STAT2 nuclear accumulation. Journal of Virology 77: 11842–11845.
37. Young DF, Chatziandreou N, He B, Goodbourn S, Lamb RA, et al. (2001) Single amino acid substitution in the V protein of simian virus 5 differentiates its ability to block interferon signaling in human and murine cells. Journal of Virology 75: 3363–3370.
38. Parisien JP, Lau JF, Horvath CM (2002) STAT2 acts as a host range determinant for species-specific paramyxovirus interferon antagonism and simian virus 5 replication. Journal of Virology 76: 6435–6441.
39. Kraus TA, Garza L, Horvath CM (2008) Enabled interferon signaling evasion in an immune-competent transgenic mouse model of parainfluenza virus 5 infection. Virology 371: 196–205.
40. Capraro GA, Johnson JB, Kock ND, Parks GD (2008) Virus growth and antibody responses following respiratory tract infection of ferrets and mice with WT and P/V mutants of the paramyxovirus Simian Virus 5. Virology 376: 416–428.
41. Breed AC, Yu M, Barr JA, Crameri G, Thalmann CM, et al. (2010) Prevalence of henipavirus and rubulavirus antibodies in pteropid bats, Papua New Guinea. Emerg Infect Dis 16: 1997–1999.
42. Iehle C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, et al. (2007) Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. Emerg Infect Dis 13: 159–161.
43. Chatziandreou N, Young D, Andrejeva J, Goodbourn S, Randall RE (2002) Differences in interferon sensitivity and biological properties of two related isolates of simian virus 5: a model for virus persistence. Virology 293: 234–242.
44. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, et al. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 17264–17269.
45. Wansley EK, Parks GD (2002) Naturally occurring substitutions in the P/V gene convert the noncytopathic paramyxovirus simian virus 5 into a virus that induces alpha/beta interferon synthesis and cell death. J Virol 76: 10109–10121.
46. Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S (2002) The V proteins of simian virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. Virology 303: 33–46.
47. Selvey LA, Wells RM, McCormack JG, Ansford AJ, Murray K, et al. (1995) Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. Med J Aust 162: 642–645.
48. Chant K, Chan R, Smith M, Dwyer DE, Kirkland P (1998) Probable human infection with a newly described virus in the family Paramyxoviridae. The NSW Expert Group. Emerg Infect Dis 4: 273–275.
49. Crameri G, Todd S, Grimley S, McEachern JA, Marsh GA, et al. (2009) Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. PLoS One 4: e8266.
50. Virtue ER, Marsh GA, Baker ML, Wang LF (2011) Interferon production and signaling pathways are antagonized during henipavirus infection of fruit bat cell lines. PLoS One 6: e22488.
51. Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Ito Y (2005) Human parainfluenza virus type 4 is incapable of evading the interferon-induced antiviral effect. Journal of Virology 79: 14756–14768.
52. Karron RA, Collins PL (2007) Parainfluenza viruses. In: David M. Knipe PMH, editor. Fields Virology, 5th ed: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 1497–1526.
53. Schaap-Nutt A, D'Angelo C, Amaro-Carambot E, Nolan SM, Davis S, et al. (2010) Recombinant human parainfluenza virus type 2 with mutations in V that

permit cellular interferon signaling are not attenuated in non-human primates. Virology 406: 65–79.
54. Schaap-Nutt A, Higgins C, Amaro-Carambot E, Nolan SM, D'Angelo C, et al. (2011) Identification of human parainfluenza virus type 2 (HPIV-2) V protein amino acid residues that reduce binding of V to MDA5 and attenuate HPIV-2 replication in nonhuman primates. Journal of Virology 85: 4007–4019.
55. Devaux P, Hudacek AW, Hodge G, Reyes-Del Valle J, McChesney MB, et al. (2011) A recombinant measles virus unable to antagonize STAT1 function cannot control inflammation and is attenuated in rhesus monkeys. Journal of Virology 85: 348–356.
56. Caignard G, Bourai M, Jacob Y, Tangy F, Vidalain PO (2009) Inhibition of IFN-alpha/beta signaling by two discrete peptides within measles virus V protein that specifically bind STAT1 and STAT2. Virology 383: 112–120.
57. Mendoza JA, Jacob Y, Cassonnet P, Favre M (2006) Human papillomavirus type 5 E6 oncoprotein represses the transforming growth factor beta signaling pathway by binding to SMAD3. Journal of Virology 80: 12420–12424.
58. Lin R, Genin P, Mamane Y, Hiscott J (2000) Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. Mol Cell Biol 20: 6342–6353.
59. Caignard G, Guerbois M, Labernardiere JL, Jacob Y, Jones LM, et al. (2007) Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling. Virology 368: 351–362.

II. Annexe 2 : Revue sur les modèles animaux applicables aux Henipavirus

Pathogens **2013**, *2*, 264-287; doi:10.3390/pathogens2020264

OPEN ACCESS

pathogens

ISSN 2076-0817

www.mdpi.com/journal/pathogens

Review

Henipavirus Infections: Lessons from Animal Models

Kévin P. Dhondt [1] and Branka Horvat [2,*]

[1] International Center for Infectiology Research, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, University of Lyon 1, 21 Avenue T. Garnier, Lyon 69007, France; E-Mail: kevin.dhondt@inserm.fr

[2] International Center for Infectiology Research, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Ecole Normale Supérieure de Lyon, University of Lyon 1, 21 Avenue T. Garnier, Lyon 69007, France; E-Mail: branka.horvat@inserm.fr

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: branka.horvat@inserm.fr; Tel.: +33-43728-2392; Fax: +33-43728-2391.

Received: 6 March 2013; in revised form: 2 April 2013 / Accepted: 4 April 2013 / Published: 9 April 2013

Abstract: The *Henipavirus* genus contains two highly lethal viruses, the Hendra and Nipah viruses and one, recently discovered, apparently nonpathogenic member; Cedar virus. These three, negative-sense single-stranded RNA viruses, are hosted by fruit bats and use EphrinB2 receptors for entry into cells. The Hendra and Nipah viruses are zoonotic pathogens that emerged in the middle of 90s and have caused severe, and often fatal, neurologic and/or respiratory diseases in both humans and different animals; including spillover into equine and porcine species. Development of relevant models is critical for a better understanding of viral pathogenesis, generating new diagnostic tools, and assessing anti-viral therapeutics and vaccines. This review summarizes available data on several animal models where natural and/or experimental infection has been demonstrated; including pteroid bats, horses, pigs, cats, hamsters, guinea pigs, ferrets, and nonhuman primates. It recapitulates the principal features of viral pathogenesis in these animals and current knowledge on anti-viral immune responses. Lastly it describes the recently characterized murine animal model, which provides the possibility to use numerous and powerful tools available for mice to further decipher henipaviruses immunopathogenesis, prophylaxis, and treatment. The utility of different models to analyze important aspects of henipaviruses-induced disease in humans, potential routes of transmission, and therapeutic approaches are equally discussed.

Keywords: emergent infections; zoonosis; pathogenesis; animal models

1. Introduction

The Hendra and Nipah viruses (HeV and NiV) are recently emerged zoonotic viruses responsible for outbreaks of respiratory and neurological disease in livestock and humans. Both are negative-sense single stranded RNA viruses and belong to the *Henipavirus* genus within the *Paramyxoviridae* family [1]. Very recently, a third member, the Cedar virus, joined the *Henipavirus* genus. While HeV and NiV infection are known to cause very high mortality rates, ranging between 40 and 100% in both humans and animals [2,3], the Cedar virus seems to be nonpathogenic. Henipaviruses genomes are among the largest of the *Paramyxoviridae* family, exceeding 18kb, with sequence homology between HeV and NiV ranging from 78 to 92%, and between HeV and Cedar virus from 28% to 58% [4]. Henipaviruses virions consist of six structural proteins. The genomic RNA is enclosed by nucleocapsid proteins, which together with phosphoprotein and RNA polymerase large protein forms the transcriptase complex. The viral envelope is formed by matrix proteins associated to a lipid bi-layer and two surface glycoproteins, glycoprotein and fusion protein, which allow, respectively, viral attachment and entry into the host cell. As in other paramyxoviruses, P gene encodes for non-structural proteins: C protein from the alternative open reading frame and W and V proteins, following RNA transcriptional editing, although this editing ability of viral polymerase seems to be absent in the Cedar virus [4].

HeV was identified as the causative agent of an outbreak of acute respiratory disease in humans and thoroughbred horses in Brisbane, Australia in 1994 [5]. Since its first appearance, HeV has re-emerged several times and presents a serious threat to horse livestock in Australia, with sporadic and lethal transmission to humans. NiV was first recognized following a 1998-99 outbreak of severe febrile encephalitis in Malaysia and Singapore [6,7]. Subsequent outbreaks of NiV occurred in India and almost annually in Bangladesh [8–10], where the sequence of Bangladesh isolate of NiV was shown to differ slightly from the Malaysia isolate [11]. Comparison between Malaysia and Bangladesh isolates revealed a nucleotide variation range of 6.32%–9.15% and an amino acid variation range of 1.42%–9.87% [12]. Survivors of acute encephalitis may experience relapse encephalitis years after initial infection and people that get infected asymptomatically may develop a late onset disease [13]. Cases of inter-human transmission of NiV-Bangladesh further extends its potential to cause deadly outbreaks [14,15]. Furthermore, the distribution area of henipaviruses and henipa-like viruses ranges outside Australia and Asia. Serological evidence found in African fruit bats [16] suggests the circulation of henipa-like viruses across this continent and new viruses will probably join this genus in the future. The ability to cause serious human and animal diseases which can be transmitted from one individual to another, and the lack of efficient treatment and preventive measures, led to the classification of HeV and NiV as biosecurity level 4 (BSL-4) pathogens.

The cellular and molecular basis of high pathogenicity of HeV and NiV is still far from being understood. The development of adequate animal models is required for better comprehension of *Henipavirus* infection and their transmission as well as for the generation of efficient prevention and treatment. As these viruses are zoonotic, there are a number of different animal species susceptible to

infection. Some of them are natural hosts and their investigation could provide useful information about virus replication, shedding, and transmission. Laboratory animal models were developed to evaluate vaccines and anti-viral treatments. Finally, the relevance of different models for understanding the infection in humans varies among models. This review discusses the major characteristics of animal models used to study HeV and NiV infection and summarizes the principal features of viral pathogenesis in the most commonly used models (Table 1).

2. Fruit Bats

There is increasing evidence that bats play a major role in the emergence and transmission of new and deadly zoonotic viruses [62,63]. Fruit bats (Pteropus species) are putative natural reservoir hosts for a number of viruses, including NiV, HeV, and the Ebola virus. Although these viruses often cause asymptomatic infections in their natural host, once they cross the species barrier they can become extremely virulent with high mortality rates. Serological studies have shown that the seroprevalence of antibodies to henipaviruses in pteropid bats varies from 10% to 50% in numerous countries, including Australia [64,65], Malaysia [66], India [67], Cambodia [68,69], Indonesia [70], and Thailand [71]. Subsequent analysis showed serological evidence for henipaviruses in China [72], Madagascar, Papua New Guinea, and Ghana [73], thus, expanding significantly the known distribution of these viruses. HeV was initially isolated from uterine fluid and fetal tissue of a *Pteropus policephalus* and *P. alecto* [65]. NiV was isolated from urine of *P. hypomelanus* in Malaysia [74], and *P. lylei* in Cambodia [69]. Analysis of captive *P. vampyrus* showed high seroprevalence and horizontal transmission of the Nipah virus [75]. Finally, a new member of *Henipavirus* genus, the Cedar virus, was recently isolated from urine samples from Australian flying foxes [4].

Experimental infection of fruit bats with HeV and NiV virus was followed by seroconversion in the majority of animals but showed absence of visible clinical disease, despite the inoculation of rather high viral doses. HeV infection of grey-headed fruit bats (*P. poliocephalus*) resulted in vascular lesions, positive immunostaining, and virus isolation [18]. Virus was also recovered from the fetus, confirming that pathogenesis in pregnant animals may result in viral crossing of the placenta, supporting thus the possibility of vertical transmission. However, transmission of HeV from bats to horses could not be experimentally demonstrated [18]. Experimental subcutaneous NiV infection in grey-headed fruit bats resulted in generation of neutralizing antibodies and histological changes in different tissues. The isolation of the virus was possible from the urine, kidney, and uterus [17]. Oronasal *Henipavirus* infection of bats gave only occasional seroconversion. Virus isolation was usually not possible, although HeV was isolated from one *P. alecto* female in that study [19]. Occasional low-level excretion of henipaviruses in the urine of bats may be sufficient to sustain virus circulation in bat colonies. Nevertheless, the rare and sporadic spillovers seem to require the coincidence of a range of individual and environmental factors. Taken together, these studies demonstrate that fruit bats can carry henipaviruses, without the manifestations of clinical disease or any gross pathology, in contrast to most of other mammalian species. However, the mechanism responsible for the efficient control of viral replication in bats remains to be elucidated. Understanding how bats coexist with viruses has important implications in predicting spillover events from bats to other susceptible species.

Table 1. Principal characteristics and current utilization of animal models of NiV (white fields) and HeV (grey fields) infection. +++ advised model, ++ highly suitable model, + suitable model, +/- better models existing, - model not recommended.

Species	Clinical signs		Gross lesions	Histology	Virus found in	Utilisation of the model					References
	Respiratory	Neurological				Pathology	Immunology	Drugs assessment	Vaccine assessment	Epidemiology	
Fruit bat	-	-	petechial hemorrhages on urine bladder wall	granulomatous hepatitis, inflammation of bladder epithelium, vasculitis, testicular degeneration	kidney, urine, uterus	-	+	-	-	+++	[17]
	-	-	-	necrosis and hemorrhage of the adrenal gland	urine, rectal swab						[18,19]
Pig	severe non-productive cough	shivering, seizures	lymph nodes hyperplasia, congestion, edema	hyperplasia of BALT, meningitis, encephalitis	lymphoid organs, CNS, lung	+	+	++ (vet. use)	++ (vet. use)	+++	[20–24]
	cough, respiratory distress	incoordination (transient)	congestion, hemorrhages	syncytial cells in nasal turbinates and bronchiolar epithelium	tonsils, BALF, lung, nasal turbinates, lymph nodes, swabs						[25]
Horse	-	-	-	meningitis	-	+	-	++ (vet. use)	++ (vet. use)	+++	[26]
	increased respiratory rate, frothy nasal discharge	ataxia, head pressing, myoclonic twitches	congestion, edema, hemorrhages in lung	interstitial pneumonia, vasculitis, syncytia in endothelium	brain, lung, lymphoid organs, kidney, bronchial and oral swabs, urine						[5,18,27,28]

Table 1. *Cont.*

Species	Clinical signs		Gross lesions	Histology	Virus found in	Utilisation of the model					References
	Respiratory	Neurological				Pathology	Immunology	Drugs assessment	Vaccine assessment	Epidemiology	
Cat	tachypnea, dyspnea	-	congestion ,edema, hemorrhages, enlarged lymph nodes	acute bronchiolitis, necrotizing alveolitis, vasculitis, endothelial syncytia	lung, spleen, kidney, lymph nodes	+/-	-	+	++	-	[21,29–31]
	dyspnea, open mouth breathing	-	hydrothorax, congestion, edema, hemorrhages	inflammation in lung, alveolar wall necrosis, vasculitis, endothelial syncytia	lung, spleen, lymph nodes						[18,32–34]
Ferret	dyspnea, cough, serous nasal discharge	depression, tremors, myoclonus, hind limb paresis	edema, hemorrhages, enlarged lymph nodes	necrotizing alveolitis, glomerular necrosis, vasculitis, endothelial syncytia, meningitis	brain, lung, lymphoid organs, adrenal, kidney, testes, uterus, liver, pharyngeal and rectal swabs	+	-	++	++	-	[35–38]
	-	depression, tremors			lung, lymphoid organs, adrenal, meninges, kidney, liver, testes, oral and rectal swabs, blood, urine						[39]

Table 1. *Cont.*

Species	Clinical signs		Gross lesions	Histology	Virus found in	Utilisation of the model					References
	Respiratory	Neurological				Pathology	Immunology	Drugs assessment	Vaccine assessment	Epidemiology	
Squirrel Monkey	dyspnea, tachypnea	ataxia, coma, seizures	not reported	pulmonar inflammation, mild vasculitis	lung, brain, kidney, spleen	+	+	+/-	+/-	-	[40]
African Green Monkey	severe dyspnea, open-mouth breathing, serosanguineous nasal discharge	muscle twitches, behavioral changes, loss of balance	pleural effusion, congestion and hemorrhage in lungs, hemorrhages on mucosal surface of urinary bladder, edema and hemorrhages of the meninges	endothelial syncytial cells, vasculitis, meningitis, inflammation, fibrinoid necrosis	liver, spleen, kidney, adrenal gland, lung, lymph nodes, pancreas, sex organs, urine, nasal swabs	+++	+	+++	+++	-	[41,42]
	nasal discharge, labored breathing	muscle twitches, seizures	pulmonary consolidation, congestion of lungs, enlarged lymph nodes, congested liver, inflammation of gastrointestinal tract, congestion in the brain	alveolar hemorrhages, pulmonary edema and inflammation, alveolitis, fibrinoid necrosis, vasculitis, meningitis	lung, lymph nodes, heart, liver, spleen, kidney, adrenal gland, brain, urinary bladder, sex organs						[43,44]

Table 1. *Cont.*

Species	Clinical signs		Gross lesions	Histology	Virus found in	Utilisation of the model					References
	Respiratory	Neurological				Pathology	Immunology	Drugs assessment	Vaccine assessment	Epidemiology	
IFNAR KO mouse	-	behavioral troubles, ataxia, pain, paralysis	brain and lung congestion, edema of bladder wall, hemorrhages, necrosis in liver and kidney	vasculitis, inflammation, meningitis, encephalitis, necrotizing alveolitis	brain, lung, spleen, liver	+	+++	+++	+	-	[45]
	-		brain and lung congestion, hemorrhages	vasculitis, meningitis, encephalitis, gliosis, necrotizing alveolitis	brain, lung, spleen, liver						[45]
Aged mouse	-	-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-
	-	ataxia, muscle tremors	-	encephalitis, meningitis	brain, transiently in lung						[46]
Hamster	labored breathing, serosanguineous nasal exudates	imbalance, muscle twitching, tremor, limb paralysis	edema, hemorrhages, congestion	vasculitis, meningitis, encephalitis, endothelial syncytia	lung, nasal epithelium, CNS, heart, liver, spleen, kidney, bladder, urine	+++	+/-	++	++	+	[47–58]

Table 1. *Cont.*

Species	Clinical signs		Gross lesions	Histology	Virus found in	Utilisation of the model					References
	Respiratory	Neurological				Patho-logy	Immu-nology	Drugs assess-ment	Vaccine assess-ment	Epide-miology	
Hamster	acute respiratory distress, serosanguineous nasal discharge	imbalance, ataxia, muscle twitching, limb paralysis	inflammation and edema of the lungs	inflammation, alveolitis, necrotizing vasculitis, meningitis, encephalitis, hemorhage in the brain, neuronal necrosis, gliosis, endothelial syncytial cells	spleen, kidney, heart, lung, brain, liver						[48,56,58,59]
Guinea pig	-	mild behavioral changes, ataxia	mesenteric edema	vasculitis, lymphoid depletion, endothelial syncytia with fibrinoid necrosis, edema, hemorrhage and ulceration of the urinary bladder, meningitis	heart, kidney, lymph nodes, uterus	-/+	-	-	-	-	[17]
	-	head tilt	congestion, cyanosis, edema	pulmonar fibrinoid necrosis, vasculitis, endothelial syncytia, encephalitis	brain, kidney, urine, uterus, placenta						[34,60,61]

3. Farm and Domestic Animals

Despite the poor ability of most *Paramyxoviridae* to cross species-barriers, henipaviruses are able to infect a broad range of mammalian species. The susceptibility of several mammalian species to natural infection with NiV and HeV is mainly responsible for their emergence in Southeast Asia and re-emergence each year in Australia and Bangladesh. This observation may be explained by the high conservation of the viral entry receptors, Ephrin (EFN) B2 and B3, amongst mammalian species. Indeed, protein sequence analysis revealed that identity between human and horse, pig, cat, dog, *Pteropus* bat, and mouse EFN B2 and B3 ranges from 95% to 98% [76]. Contrarily to NiV and HeV that can use both EFN B2 and B3 receptors [77], the Cedar virus was shown to use EFN B2 receptor only [4].

Farm and domestic animals often play the role of intermediate hosts between the wild reservoir and the human population. Rapidly, after viral emergence, pigs and horses were found to be amplifying secondary hosts, respectively for Malaysia NiV strain and HeV. Yet, looking for secondary reservoirs a broad range of animal species were serologically tested. Birds [9,78], peri-domestic and domestic rodents [9,66,78,79], wild boars, and insectivorous bats [66] tested negative. Both cats and dogs were found to be susceptible to NiV infection even if there were only two field cases for dogs and one field case for cats [26]. Studies showed that a very close contact with infected pigs is necessary for infection of these species. Indeed, feral cats [80] and dogs [81] from non-infected pig farms, but in contact with potentially infected fruit bats, were seronegative. In Bangladesh, human cases were associated with contact with sick cows [9] and goats [15], but no clinical or serological studies were able to confirm this transmission. In Australia, the only natural HeV infection in a species other than horses and bats was reported in 2011 and concerned a healthy seropositive dog from an infected property [82].

3.1. Pigs

In a natural context, NiV infection in pigs most likely occurs from oronasal contact with infected urine, faeces, or saliva from bats. The spreading of NiV from pig to pig is very high with a morbidity rate close to 100%, whereas the lethality rate varies between 1% to 40% depending on the age of the animal. Infection is usually asymptomatic, but some pigs showed respiratory signs characterized by a severe nonproductive cough (“barking pig syndrome”) and sudden death [20]. The study of NiV infection in pigs in an experimental context was rapidly carried out after the discovery of the virus. Oronasal and ocular routes mimic, quite well, natural infection and most infected animals remain asymptomatic [21–23] even if viral shedding is observed in nasal and pharyngeal swabs from three to seven days post-infection [23]. Sick animals present fever, depression, cough, shivering, and rarely, neurological signs including abnormal posture [24] and seizures [23]. Subcutaneous route was also tested with an increase in severity and frequency of respiratory and neurological signs [21]. Gross pathology findings include hyperplasia of submandibular, mesenteric, and bronchial lymph nodes, congestion and oedema of meninges [24] and lung consolidation. Histology reveals hyperplasia of BALT, non-suppurative meningitis, and encephalitis [21]. Immunohistology shows evidence of invasion of the central nervous system through olfactory nerves [23]. Infected pigs are able to develop neutralizing antibodies to high titers within two weeks, post-infection. In Africa, cross-reactive but not

cross-neutralizing antibodies to HeV or NiV were found in pigs, confirming the presence of circulating henipa-like viruses in this geographic area [83].

Studies based on NiV infection of pigs provided new insights of the role of peripheral blood mononuclear cells. In contrast to what has been seen in human lymphocytes [84], certain populations of swine lymphocytes seem to be permissive to NiV infection [85]. Piglets that succumbed to NiV infection had a significant drop in the CD4+CD8− T cell frequency compared to those that survived. As these T helper lymphocytes aid the development of humoral responses, this observation supports the hypothesis that a rapid production of virus-specific antibodies is necessary for a fully protective anti-NiV response [85]. Moreover, experimental infection of piglets with NiV induced a lymphoid depletion in lymph nodes that was responsible for subsequent bacterial infection of immunodepressed animals [24]. Lymphotropism remains so far a unique attribute of NiV infection in swine and may account for some features of pigs as a spillover host.

The only attempt to infect pigs with HeV reports that nasal and oronasal inoculation usually induce respiratory symptoms both in farm pigs and minipigs. Some neurological signs (incoordination) were transiently observed on Gottingen minipigs [25]. At necropsy, a congestion of lungs and petechial hemorrhages on multiple organs were observed. Syncytial cells were frequently noticed in the respiratory epithelium of nasal turbinates and the bronchiolar epithelium. Viral RNA was detected in decreasing order for nasal, oral, rectal, and ocular swabs. Virus was successfully isolated from tonsils, bronchial-alveolar lavage fluid (BALF), lung and olfactory bulbs, nasal turbinates, submandibular and bronchial lymph nodes and swabs. Pigs developed neutralizing antibodies from day five to seven after infection.

3.2. Horses

Horses were used as a first animal model of henipaviruses infection, to confirm that HeV (called equine morbillivirus in that period) is the etiological agent of the new infectious disease [5]. The clinical course of HeV, in both naturally and experimentally infected horses, is relatively short, with death occurring within 48 h after the onset of clinical signs. Experimental studies reveal an incubation period ranging from five to 10 days following infection [5,18,27]. Whatever the route of infection (intranasal [5,18,27], intravenous [5], or subcutaneous [18]), affected horses usually present a febrile syndrome (>40 °C), depression, increased respiratory and heart rates, and as the disease progresses, frothy nasal discharge and neurological disabilities such as ataxia, head pressing [28], and myoclonic twitches [18]. Some horses seroconverted but still remained asymptomatic following subcutaneous [18] or natural [5] infection. Gross pathology is preferentially found in the lung area where congestion, edema [5], dilatation of the lymphatics [18], and subpleural hemorrhages [27] were shown. Histological examination usually confirms an interstitial pneumonia and a severe systemic vasculitis [5,18,27]. The presence of syncytial giant cells is detectable in lungs, kidney, lymph nodes [27], and mostly concerns endothelial cells of the blood vessels [5]. Viral isolation has been successfully performed from bronchial and oral swabs, urine as well as from brain, blood, spleen, lung, kidney, and lymph nodes [18]. Although the recovery of viral particles was not possible in rectal swabs and feces, viral RNA was found by RT-qPCR analysis [27]. Despite viral shedding in many fluids, transmission of HeV between horses remains an unlikely event [18] and seems to require very close contact in natural conditions [86,87].

Concerning NiV, there is only one natural confirmed equine case. Histopathology on this case revealed non suppurative meningitis associated with several areas of cell depletion in the parenchyma of the brain [26].

3.3. Cats

The cat (*Felis sylvestris catus*) is a receptive animal model for both HeV and NiV infection. Rapidly after the discovery of HeV in 1994, the cat was tested for its susceptibility to infection [32]. Cats infected either by subcutaneous, intranasal, or oral routes become clinically ill within four to eight days [33,34]. The illness is restricted to a pulmonary syndrome with severe dyspnea and open mouth breathing [18,33]. The gross pathology is mainly focused in the lungs with hydrothorax and pulmonary edema associated with congestion and intrapulmonary hemorrhages [34]. The bronchial and mesenteric lymph nodes are enlarged, pale, and sometimes present petechial hemorrhages. The spleen is also enlarged. Histopathology of the lung is consistent with gross findings and confirmed the edema and hemorrhages. These observations are completed with a high number of alveolar macrophages, alveolar wall necrosis, and vascular lesions including thrombosis, fibrinoid necrosis, and endothelial syncytia [34]. Transmission of the virus is possible from cat to cat [33], and from cat to horse [18] but remains a relatively rare event.

The use of cats to study NiV was also assessed using either intranasal [21] or subcutaneous routes [29]. The clinical signs are relatively similar to those observed following HeV infection and include febrile syndrome, mental depression, tachypnea, and dyspnea [21,29]. Necropsy and histology indicate similar results to those found for HeV. Infectivity of cats via oronasal route was not assessed for NiV, but the vertical transmission from the female to the fetus was demonstrated. Placenta, uterine fluids, and fetal tissues were positive for NiV replication. The placenta and placental fluids contained a significant titer of virus [30] thus indicating a potential role of pregnancy in the shedding of the virus by fruit bats. Although the cat is a very susceptible model for henipaviruses infection, its utilization to study human pathology is still controversial as it does not present the neurological signs observed in humans.

The cat model was used to assess the potential of a vaccine that uses the recombinant soluble form of either HeV or NiV G protein, to protect against NiV infection [29]. Cats generated a good IgG and IgA antibody response towards NiV, especially with sHeV G subunit vaccine [31], and all vaccinated animals survived a NiV challenge.

3.4. Ferrets

Ferrets (*Mustela putorius*) are a suitable model for many respiratory diseases, including *Henipavirus* infection. Oronasally NiV infected ferrets develop clinical signs within six days post-infection including fever, severe depression, tremors, myoclonus [35], and hind limb paresis [36,37] but also respiratory signs such as dyspnea, cough, and serous nasal discharge [38]. Clinical signs of HeV infected animals are restricted to fever, depression, and generalized tremors from day six, post-infection, whatever the dose inoculated (from 50 to 50000 $TCID_{50}$) [39]. Gross lesions are similar for both henipaviruses and show subcutaneous edema, petechial hemorrhages throughout the skin, the pulmonary parenchyma and the abdomen but also enlarged and hemorrhagic submandibular,

retropharyngeal, bronchial, duodenal, and mesenteric lymph nodes [36–39]. Histopathology performed on infected tissues reveals acute focal necrotizing alveolitis and glomerular necrosis, systemic vasculitis with prominent endothelial syncytia, and focal necrosis of the spleen [38]. Non-suppurative meningitis was noticed in animals that presented neurological signs [38]. HeV antigens were identified in meningeal endothelial cells [39] and NiV antigens were found in the brain parenchyma [38]. Viral shedding was demonstrated by quantitative PCR from all fluids [37] especially in blood, pharyngeal and rectal swabs [38] and urine [39]. Viral isolates were successfully recovered from feces and urine in one study, especially between day seven and nine post-infection [35]. Comparative analysis between Malaysia and Bangladesh strains of NiV shows similar clinical signs. The Malaysia strain-infected ferrets present however a more pronounced hemorrhagic state. Concerning transmission of the virus, analysis of oral shedding reveals the Bangladesh strain to be more excreted than the Malaysia strain [35].

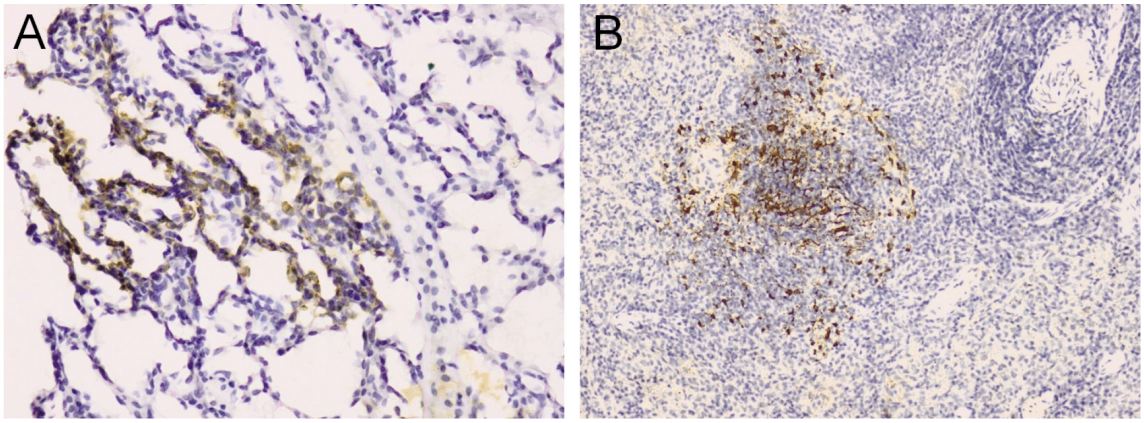
Ferrets were used to assess the efficiency of chloroquine as potential treatment of NiV infection, where no significant effect was observed [37]. They were then used in the successful evaluation of passive [38] or active [39] immunotherapy respectively based on human monoclonal antibodies or recombinant HeV G glycoprotein-based subunit vaccine. Neutralizing antibodies from ferrets infected by the Cedar virus were detected as early as 10 days post-infection and at high titer 21 days post-infection although the ferrets remained clinically healthy [4].

4. Non-Human Primate Models

The development of primate models is necessary for preclinical tests of preventive and therapeutic anti-viral approaches. The first nonhuman primate model described for NiV infection was the Squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) [40]. Clinical illness with an acute neurological and respiratory syndrome associated with high mortality was observed in intravenously infected monkeys. Viral RNA and antigens were detected in different tissues (Figure 1). High antibody-neutralization titers were found only in monkeys that survived infection. Similarly to what has been shown in hamsters, free virus was not found in plasma of Squirrel monkeys, but rather virus was associated with the cell compartment, in accordance with the hypothesis that NiV could use circulating cells as carriers for efficient transmission within a host [84]. As observed in human infection of the Malaysian outbreak [88], only half of the challenged animals exhibited clinical signs, making this model potentially interesting to understand NiV pathogenesis in humans, although less convenient, compared to the other described animal models for the assessment of anti-viral approaches.

In a second primate model, African green monkeys (AGM) were evaluated for both NiV and HeV infection [41,43]. Virus challenge by intratracheal inoculation, of either NiV or HeV, resulted in a rapid spread of the virus and infection of multiple organs, leading to high mortality. Severe respiratory pathology, neurological disease, endothelial syncytia, and generalized vasculitis were observed with both viruses. Immunohistochemical analysis showed the presence of viral antigens in different organs including lungs, the brainstem, and spleen.

Figure 1. Immunohistochemistry analysis from NiV-infected Squirrel Monkeys. (**a**) Lung. Inflammation associated with positive immunostaining (brown) in the alveolar wall; (**b**) Spleen. Positive immunostaining (brown) located in the white pulp. Original magnification 20×.



The AGM model was shown to be a useful tool to evaluate antiviral therapy and prophylaxis in primates. The efficiency of ribavirin as a prophylactic and postexposure treatment was evaluated in HeV infection, demonstrating that it could delay disease onset without having significant benefit for disease progression and outcome [43]. Passive and active immunization against HeV and NiV, respectively, were proven to be successful in this model with the use of a recombinant human monoclonal antibody possessing virus-neutralizing properties [44] and a G glycoprotein subunit vaccine [42].

5. Rodent Models

5.1. Golden Syrian Hamster

The Golden Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) is a commonly used model to study henipaviruses pathogenesis as the clinical signs and pathological lesions observed following intranasal or intraperitoneal inoculation highly resemble those observed in humans. When infected with NiV, the golden hamster shows a progressive behavioral deterioration, lethargy, imbalance, muscle twitching, tremors, and limb paralysis [47]. At high doses (10^5 $TCID_{50}$), and particularly when inoculated intranasally, the clinical signs are mainly restricted to an acute respiratory syndrome with labored breathing and serosanguineous nasal exudates [48]. Radiography experiments revealed that morphological changes of the lung begin as rapidly as two days post-infection. At necropsy, the edema of the lung was evidenced by a two times increase in lung weight. Viral isolates can be recovered from lung and tracheal tissues. Syncytial cells were observed in bronchial epithelium and endothelium of blood vessels although no viremia was detected. Many hemorrhages were also noted in the lung parenchyma, especially with HeV [48]. Lower doses also result in respiratory signs but are followed by neurological disabilities. In these animals, the lesions are widespread and can be found in heart, liver, kidney, bladder, brain, lung, and nasal epithelium [48]. RT-qPCR analysis revealed the presence

of the virus in these organs, and also in urine. The lesions were largely represented by vasculitis but also inflammation in lung and brain where infected neurons were found [47].

Recent immunohistological evidence suggests that NiV is able to rapidly invade the central nervous system via olfactory route following an intranasal challenge [89]. The breach of the blood brain barrier, evidenced by an Evans Blue experiment, also reveals that the endothelium of the brain is permeable enough to let the virus circulate from systemic circulation to the brain [48]. Isolation of NiV is restricted to brain and kidney when animals are infected intranasally but is also possible from urine, spinal cord, lung, spleen, and liver when infected intraperitoneally [47]. Despite excretion of the virus in urine, transmission studies reveal that contamination by direct contact is not frequent and even less via fomites or aerosol routes [49].

Similarly to tests performed in ferrets [35], comparison of the pathogenicity of NiV isolates from Malaysia and Bangladesh was performed in hamsters. Results suggest that the Malaysia isolate has a faster replication rate and is more pathogenic than the Bangladesh isolate in which death is delayed. However, the clinical signs of the two isolates remain identical as well as viral distribution. In accordance with the accelerated pathology observed with the Malaysia isolate, the host immune response genes (especially IL-4, CXCL10, IL-6, TNFα and IFNγ) are activated earlier than for the Bangladesh isolate [50].

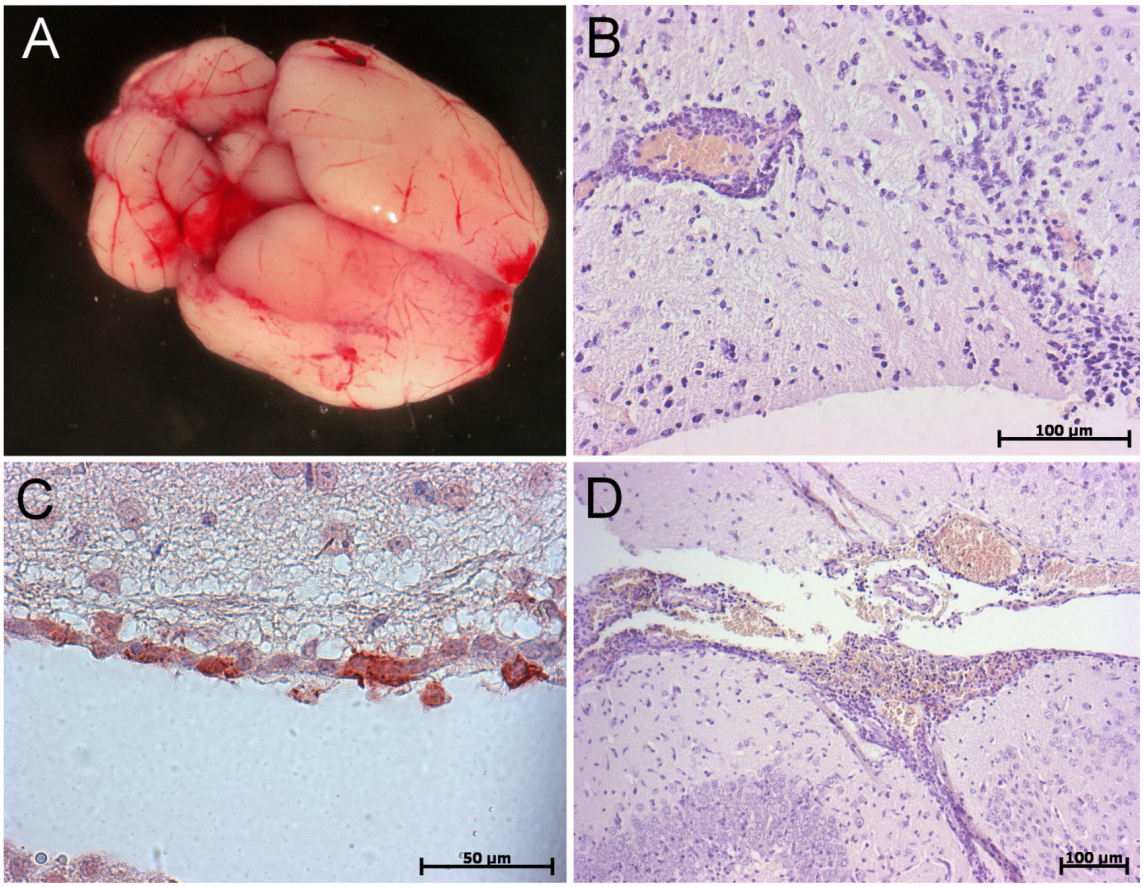
Overall, hamsters provide a significant improvement in understanding of henipaviruses immunopathogenesis. Their use has helped to determine the role of the non-structural proteins during the course of infection. Indeed, infection of hamsters with a recombinant virus lacking W protein remains highly lethal whereas recombinant viruses deficient for V or C proteins are nonpathogenic [51], reflecting the potential role of the V and C proteins in the dysregulation of the innate immune response. Furthermore, C-deficient NiV induces higher recruitment of inflammatory cells and less intensive histopathological lesions than wild-type NiV, in different organs of infected hamsters, thus suggesting the important role of NiV C protein in the regulation of early proinflammatory responses [52]. Finally, in agreement to the results obtained from transcriptomic analysis of NiV infected endothelial cells and patients succumbed to NiV-induced encephalitis, NiV infection in hamsters induces the important expression of proinflammatory chemokine CXCL10 in different organs [48,53,90]. This cytokine was confirmed to play an important role in HeV pathogenesis as well, and it was demonstrated that the development of neurological signs in both NiV and HeV infection coincided with tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 production in hamsters [48,53].

Hamsters are also able to mount a good henipaviruses-specific seroneutralizing response after infection. They are thus extensively used to study potential vaccines [54,58], to monitor passive immunization assays [54,55,59] or to test new treatments [56,57] and they remain commonly used by different groups.

5.2. Guinea Pig

The Guinea Pig (*Cavia porcellus*) was the first susceptible rodent model developed to study infection with henipaviruses. However, due to high variability in results and development of new models, it lost its importance as a relevant animal model for the study of *Henipavirus* infection. Intradermal [60] and intranasal [25,60] inoculation were proven to be inefficient but subcutaneous injection of a high dose

Figure 2. Gross pathology and immunohistology of IFNAR KO mice infected with NiV (**a**) Brain showing hemorrhages and congestion; (**b**) Vasculitis associated with leukocytes infiltration of the brain parenchyma; (**c**) Positive immunostaining of NiV antigens in the ependymal layer of a ventricle; (**d**) Hemorrhages, vasculitis and pronounced meningitis.



6. Conclusions and Perspectives

The changing ecological pressures on flying foxes owing to deforestation, urban development, altered foraging, and behavioral patterns all play a role in the continuing reemergence of *Henipavirus* infections. Since 1994, animal models have provided significant advances in fundamental research into henipaviruses and given critical support to discover and assess potential prophylactic and therapeutic treatments. Future challenges in this field will include the comprehension of the mechanisms allowing the efficient control of viral replication in fruit bats, which can give rise to original therapeutic approaches. The recent discovery of the third nonpathogenic member of *Henipavirus* genus, the Cedar virus, offers new possibilities for comparative analysis of henipaviruses immunopathogenesis. The use of appropriate laboratory animal models is critical for correct studies and further development of antiviral therapeutics and vaccines. As showed in Table 1, the choice of the most accurate animal model strongly depends of the goal of the study, and should be done in accordance with the particularities and limitations of each model. The recent discovery of susceptibility of genetically

modified mice to *Henipavirus* infection opens new avenues in the field of the immunobiology of these viruses. The use of a small animal model for which many experimental tools are available should improve our understanding of the control of this highly lethal infection and will provide significant help to develop new treatments and prevention.

Acknowledgments

The work was supported by ANR, ECOFECT and INSERM, KD was supported by DGA and INSERM.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eaton, B.T.; Broder, C.C.; Middleton, D.; Wang, L.-F. Hendra and Nipah Viruses: different and dangerous. *Nat. Rev. Micro.* **2006**, *4*, 23–35.
2. Marsh, G.A.; Wang, L.-F. Hendra and Nipah viruses: Why are they so deadly? *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 242–247.
3. Field, H.; Kung, N. Henipaviruses — unanswered questions of lethal zoonoses. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1*, 658–661.
4. Marsh, G.A.; De Jong, C.; Barr, J.A.; Tachedjian, M.; Smith, C.; Middleton, D.; Yu, M.; Todd, S.; Foord, A.J.; Haring, V.; *et al*. Cedar virus: A novel henipavirus isolated from australian bats. *PLoS Pathogens* **2012**, *8*, e1002836.
5. Murray, K.; Rogers, R.; Selvey, L.; Selleck, P.; Hyatt, A.; Gould, A.; Gleeson, L.; Hooper, P.; Westbury, H. A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerg. Infect. Dis.* **1995**, *1*, 31–33.
6. Chua, K.B.; Bellini, W.J.; Rota, P.A.; Harcourt, B.H.; Tamin, A.; Lam, S.K.; Ksiazek, T.G.; Rollin, P.E.; Zaki, S.R.; Shieh, W.-J.; *et al*. Nipah virus: A recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **2000**, *288*, 1432–1435.
7. Wong, K.T.; Shieh, W.-J.; Kumar, S.; Norain, K.; Abdullah, W.; Guarner, J.; Goldsmith, C.S.; Chua, K.B.; Lam, S.K.; Tan, C.T.; *et al*. Nipah virus infection. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 2153–2167.
8. Chadha, M.S.; Comer, J.A.; Lowe, L.; Rota, P.A.; Rollin, P.E.; Bellini, W.J.; Ksiazek, T.G.; Mishra, A. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 235–240.
9. Hsu, V.P.; Hossain, M.J.; Parashar, U.D.; Ali, M.M.; Ksiazek, T.G.; Kuzmin, I.; Niezgoda, M.; Rupprecht, C.; Bresee, J.; Breiman, R.F. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10*, 2082–2087.
10. Stone, R. Breaking the Chain in Bangladesh. *Science* **2011**, *331*, 1128–1131.

11. Harcourt, B.H.; Lowe, L.; Tamin, A.; Liu, X.; Bankamp, B.; Bowden, N.; Rollin, P.E.; Comer, J.A.; Ksiazek, T.G.; Hossain, M.J.; *et al*. Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1594–1597.
12. Lo, M.K.; Lowe, L.; Hummel, K.B.; Sazzad, H.M.S.; Gurley, E.S.; Hossain, M.J.; Luby, S.P.; Miller, D.M.; Comer, J.A.; Rollin, P.E.; *et al*. Characterization of Nipah Virus from Outbreaks in Bangladesh, 2008–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 248–255.
13. Tan, C.T.; Goh, K.J.; Wong, K.T.; Sarji, S.A.; Chua, K.B.; Chew, N.K.; Murugasu, P.; Loh, Y.L.; Chong, H.T.; Tan, K.S.; *et al*. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann. Neurol.* **2002**, *51*, 703–708.
14. Lo, M.K.; Rota, P.A. The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J. Clin. Virol.* **2008**, *43*, 396–400.
15. Luby, S.P.; Gurley, E.S.; Hossain, M.J. Transmission of human infection with Nipah virus. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *49*, 1743–1748.
16. Drexler, J.F.; Corman, V.M.; Müller, M.A.; Maganga, G.D.; Vallo, P.; Binger, T.; Gloza-Rausch, F.; Rasche, A.; Yordanov, S.; Seebens, A.; *et al*. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 796.
17. Middleton, D.J.; Morrissy, C.J.; Van der Heide, B.M.; Russell, G.M.; Braun, M.A.; Westbury, H.A.; Halpin, K.; Daniels, P.W. Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (Pteropus poliocephalus). *J. Comp. Pathol.* **2007**, *136*, 266–272.
18. Williamson, M.; Hooper, P.; Selleck, P.; Gleeson, L.; Daniels, P.; Westbury, H.; Murray, P. Transmission studies of Hendra virus (equine morbilli-virus) in fruit bats, horses and cats. *Aust. Vet. J.* **1998**, *76*, 813–818.
19. Halpin, K.; Hyatt, A.D.; Fogarty, R.; Middleton, D.; Bingham, J.; Epstein, J.H.; Rahman, S.A.; Hughes, T.; Smith, C.; Field, H.E.; Daszak, P. Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 946–951.
20. Mohd Nor, M.N.; Gan, C.H.; Ong, B.L. Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev. Off. Int. Epizoot.* **2000**, *19*, 160–165.
21. Middleton, D.J.; Westbury, H.A.; Morrissy, C.J.; Van der Heide, B.M.; Russell, G.M.; Braun, M.A.; Hyatt, A.D. Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J. Comp. Pathol.* **2002**, *126*, 124–136.
22. Weingartl, H.M.; Berhane, Y.; Caswell, J.L.; Loosmore, S.; Audonnet, J.-C.; Roth, J.A.; Czub, M. Recombinant Nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J. Virol.* **2006**, *80*, 7929–7938.
23. Weingartl, H.; Czub, S.; Copps, J.; Berhane, Y.; Middleton, D.; Marszal, P.; Gren, J.; Smith, G.; Ganske, S.; Manning, L.; Czub, M. Invasion of the Central Nervous System in a Porcine Host by Nipah Virus. *J. Virol.* **2005**, *79*, 7528–7534.
24. Berhane, Y.; Weingartl, H.M.; Lopez, J.; Neufeld, J.; Czub, S.; Embury-Hyatt, C.; Goolia, M.; Copps, J.; Czub, M. Bacterial infections in pigs experimentally infected with Nipah virus. *Transbound. Emerg. Dis.* **2008**, *55*, 165–174.
25. Li, M.; Embury-Hyatt, C.; Weingartl, H.M. Experimental inoculation study indicates swine as a potential host for Hendra virus. *Vet. Res.* **2010**, *41*, 33.

26. Hooper, P.; Zaki, S.; Daniels, P.; Middleton, D. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 315–322.
27. Marsh, G.; Haining, J.; Hancock, T.; Robinson, R.; Foord, A.; Barr, J.; Riddell, S.; Heine, H.; White, J.; Crameri, G.; *et al*. Experimental Infection of Horses with Hendra Virus/Australia/Horse/2008/Redlands. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*.
28. Rogers, R.J.; Douglas, I.C.; Baldock, F.C.; Glanville, R.J.; Seppanen, K.T.; Gleeson, L.J.; Selleck, P.N.; Dunn, K.J. Investigation of a second focus of equine morbillivirus infection in coastal Queensland. *Aust. Vet. J.* **1996**, *74*, 243–244.
29. Mungall, B.A.; Middleton, D.; Crameri, G.; Bingham, J.; Halpin, K.; Russell, G.; Green, D.; McEachern, J.; Pritchard, L.I.; Eaton, B.T.; *et al*. Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J. Virol.* **2006**, *80*, 12293–12302.
30. Mungall, B.A.; Middleton, D.; Crameri, G.; Halpin, K.; Bingham, J.; Eaton, B.T.; Broder, C.C. Vertical transmission and fetal replication of nipah virus in an experimentally infected cat. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 812–816.
31. McEachern, J.A.; Bingham, J.; Crameri, G.; Green, D.J.; Hancock, T.J.; Middleton, D.; Feng, Y.-R.; Broder, C.C.; Wang, L.-F.; *et al*. A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* **2008**, *26*, 3842–3852.
32. Westbury, H.A.; Hooper, P.T.; Selleck, P.W.; Murray, P.K. Equine morbillivirus pneumonia: susceptibility of laboratory animals to the virus. *Aust. Vet. J.* **1995**, *72*, 278–279.
33. Westbury, H.A.; Hooper, P.T.; Brouwer, S.L.; Selleck, P.W. Susceptibility of cats to equine morbillivirus. *Aust. Vet. J.* **1996**, *74*, 132–134.
34. Hooper, P.T.; Westbury, H.A.; Russell, G.M. The lesions of experimental equine morbillivirus disease in cats and guinea pigs. *Vet. Pathol.* **1997**, *34*, 323–329.
35. Clayton, B.A.; Middleton, D.; Bergfeld, J.; Haining, J.; Arkinstall, R.; Wang, L.; Marsh, G.A. Transmission routes for nipah virus from Malaysia and Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 1983–1993.
36. Bossart, K.N.; Bingham, J.; Middleton, D. Targeted Strategies for Henipavirus Therapeutics. *Open Virol. J.* **2007**, *1*, 14–25.
37. Pallister, J.; Middleton, D.; Crameri, G.; Yamada, M.; Klein, R.; Hancock, T.J.; Foord, A.; Shiell, B.; Michalski, W.; Broder, C.C.; *et al*. Chloroquine administration does not prevent nipah virus infection and disease in ferrets. *J. Virol.* **2009**, *83*, 11979–11982.
38. Bossart, K.N.; Zhu, Z.; Middleton, D.; Klippel, J.; Crameri, G.; Bingham, J.; McEachern, J.A.; Green, D.; Hancock, T.J.; Chan, Y.-P.; *et al*. A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000642.
39. Pallister, J.; Middleton, D.; Wang, L.-F.; Klein, R.; Haining, J.; Robinson, R.; Yamada, M.; White, J.; Payne, J.; Feng, Y.-R.; *et al*. A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine* **2011**, *29*, 5623–5630.
40. Marianneau, P. Experimental infection of squirrel monkeys with Nipah virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 507–510.

41. Geisbert, T.W.; Daddario-DiCaprio, K.M.; Hickey, A.C.; Smith, M.A.; Chan, Y.-P.; Wang, L.-F.; Mattapallil, J.J.; Geisbert, J.B.; Bossart, K.N.; Broder, C.C. Development of an Acute and Highly Pathogenic Nonhuman Primate Model of Nipah Virus Infection. *PLoS One* **2010**, *5*, e10690.
42. Bossart, K.N.; Rockx, B.; Feldmann, F.; Brining, D.; Scott, D.; Lacasse, R.; Geisbert, J.B.; Feng, Y.-R.; Chan, Y.-P.; Hickey, A.C.; *et al*. A hendra virus g glycoprotein subunit vaccine protects african green monkeys from nipah virus challenge. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 146ra107.
43. Rockx, B.; Bossart, K.N.; Feldmann, F.; Geisbert, J.B.; Hickey, A.C.; Brining, D.; Callison, J.; Safronetz, D.; Marzi, A.; Kercher, L.; *et al*. A novel model of lethal hendra virus infection in african green monkeys and the effectiveness of ribavirin treatment. *J. Virol.* **2010**, *84*, 9831–9839.
44. Bossart, K.N.; Geisbert, T.W.; Feldmann, H.; Zhu, Z.; Feldmann, F.; Geisbert, J.B.; Yan, L.; Feng, Y.-R.; Brining, D.; *et al*. A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 105ra103.
45. Dhondt, K.P.; Mathieu, C.; Chalons, M.; Reynaud, J.M.; Vallve, A.; Raoul, H.; Horvat, B. Type I interferon signaling protects mice from lethal Henipavirus infection. *J. Infect. Dis.* **2012**, *207*, 142–151.
46. Dups, J.; Middleton, D.; Yamada, M.; Monaghan, P.; Long, F.; Robinson, R.; Marsh, G.A.; Wang, L.-F. A new model for hendra virus encephalitis in the mouse. *PLoS One* **2012**, *7*, e40308.
47. Wong, K.T.; Grosjean, I.; Brisson, C.; Blanquier, B.; Fevre-Montange, M.; Bernard, A.; Loth, P.; Georges-Courbot, M.-C.; Chevallier, M.; Akaoka, H.; *et al*. A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2127–2137.
48. Rockx, B.; Brining, D.; Kramer, J.; Callison, J.; Ebihara, H.; Mansfield, K.; Feldmann, H. Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J. Virol.* **2011**, *85*, 7658–7671.
49. De Wit, E.; Bushmaker, T.; Scott, D.; Feldmann, H.; Munster, V.J. Nipah virus transmission in a hamster model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, e1432.
50. Debuysscher, B.L.; De Wit, E.; Munster, V.J.; Scott, D.; Feldmann, H.; Prescott, J. Comparison of the pathogenicity of nipah virus isolates from bangladesh and malaysia in the Syrian hamster. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2024.
51. Yoneda, M.; Guillaume, V.; Sato, H.; Fujita, K.; Georges-Courbot, M.-C.; Ikeda, F.; Omi, M.; Muto-Terao, Y.; Wild, T.F.; Kai, C. The Nonstructural proteins of nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS One* **2010**, *5*, e12709.
52. Mathieu, C.; Guillaume, V.; Volchkova, V.A.; Pohl, C.; Jacquot, F.; Looi, R.Y.; Wong, K.T.; Legras-Lachuer, C.; Volchkov, V.E.; Lachuer, J.; *et al*. Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence. *J. Virol.* **2012**, In Press.
53. Mathieu, C.; Guillaume, V.; Sabine, A.; Ong, K.C.; Wong, K.T.; Legras-Lachuer, C.; Horvat, B. Lethal Nipah virus infection induces rapid overexpression of CXCL10. *PLoS One* **2012**, *7*, e32157.
54. Guillaume, V.; Contamin, H.; Loth, P.; Georges-Courbot, M.-C.; Lefeuvre, A.; Marianneau, P.; Chua, K.B.; Lam, S.K.; Buckland, R.; Deubel, V.; *et al*. Nipah virus: Vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J. Virol.* **2004**, *78*, 834–840.

55. Guillaume, V.; Contamin, H.; Loth, P.; Grosjean, I.; Georges-Courbot, M.C.; Deubel, V.; Buckland, R.; Wild, T.F. Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters. *J. Virol.* **2006**, *80*, 1972–1978.
56. Freiberg, A.N.; Worthy, M.N.; Lee, B.; Holbrook, M.R. Combined chloroquine and ribavirin treatment does not prevent death in a hamster model of Nipah and Hendra virus infection. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91*, 765–772.
57. Georges-Courbot, M.C.; Contamin, H.; Faure, C.; Loth, P.; Baize, S.; Leyssen, P.; Neyts, J.; Deubel, V. Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1768–1772.
58. Ploquin, A.; Szécsi, J.; Mathieu, C.; Guillaume, V.; Barateau, V.; Ong, K.C.; Wong, K.T.; Cosset, F.-L.; Horvat, B.; Salvetti, A. Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, 469–478.
59. Guillaume, V.; Wong, K.T.; Looi, R.Y.; Georges-Courbot, M.-C.; Barrot, L.; Buckland, R.; Wild, T.F.; Horvat, B. Acute Hendra virus infection: Analysis of the pathogenesis and passive antibody protection in the hamster model. *Virology* **2009**, *387*, 459–465.
60. Williamson, M.M.; Hooper, P.T.; Selleck, P.W.; Westbury, H.A.; Slocombe, R.F.S. A guinea-pig model of hendra virus encephalitis. *J. Comp. Pathol.* **2001**, *124*, 273–279.
61. Williamson, M.M.; Hooper, P.T.; Selleck, P.W.; Westbury, H.A.; Slocombe, R.F. Experimental hendra virus infectionin pregnant guinea-pigs and fruit Bats (Pteropus poliocephalus). *J. Comp. Pathol.* **2000**, *122*, 201–207.
62. Calisher, C.H.; Childs, J.E.; Field, H.E.; Holmes, K.V.; Schountz, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 531–545.
63. Wong, S.; Lau, S.; Woo, P.; Yuen, K.-Y. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev. Med. Virol.* **2007**, *17*, 67–91.
64. Young, P.L.; Halpin, K.; Selleck, P.W.; Field, H.; Gravel, J.L.; Kelly, M.A.; Mackenzie, J.S. Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg. Infect. Dis.* **1996**, *2*, 239–240.
65. Halpin, K.; Young, P.L.; Field, H.E.; Mackenzie, J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Comp. Pathol.* **2000**, *81*, 1927–1932.
66. Yob, J.M.; Field, H.; Rashdi, A.M.; Morrissy, C.; Van der Heide, B.; Rota, P.; Bin Adzhar, A.; White, J.; Daniels, P.; Jamaluddin, A.; *et al*. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 439–441.
67. Yadav, P.D.; Raut, C.G.; Shete, A.M.; Mishra, A.C.; Towner, J.S.; Nichol, S.T.; Mourya, D.T. Detection of Nipah virus RNA in fruit bat (Pteropus giganteus) from India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 576–578.
68. Olson, J.G.; Rupprecht, C.; Rollin, P.E.; An, U.S.; Niezgoda, M.; Clemins, T.; Walston, J.; Ksiazek, T.G. Antibodies to Nipah-like virus in bats (Pteropus lylei), Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 987–988.
69. Reynes, J.-M.; Counor, D.; Ong, S.; Faure, C.; Seng, V.; Molia, S.; Walston, J.; Georges-Courbot, M.C.; Deubel, V.; Sarthou, J.-L. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1042–1047.

70. Sendow, I.; Field, H.E.; Curran, J.; Darminto; Morrissy, C.; Meehan, G.; Buick, T.; Daniels, P. Henipavirus in Pteropus vampyrus bats, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 711–712.
71. Wacharapluesadee, S.; Boongird, K.; Wanghongsa, S.; Ratanasetyuth, N.; Supavonwong, P.; Saengsen, D.; Gongal, G.N.; Hemachudha, T. A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in Pteropus lylei bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 183–190.
72. Li, Y.; Wang, J.; Hickey, A.C.; Zhang, Y.; Li, Y.; Wu, Y.; Zhang, H.; Yuan, J.; Han, Z.; McEachern, J.; *et al*. Antibodies to Nipah or Nipah-like viruses in bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1974–1976.
73. Clayton, B.A.; Wang, L.F.; Marsh, G.A. Henipaviruses: an updated review focusing on the pteropid reservoir and features of transmission. *Zoonoses Public Health* **2013**, *60*, 69–83.
74. Chua, K.B.; Koh, C.L.; Hooi, P.S.; Wee, K.F.; Khong, J.H.; Chua, B.H.; Chan, Y.P.; Lim, M.E.; Lam, S.K. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 145–151.
75. Sohayati, A.R.; Hassan, L.; Sharifah, S.H.; Lazarus, K.; Zaini, C.M.; Epstein, J.H.; Shamsyul Naim, N.; Field, H.E.; Arshad, S.S.; Abdul Aziz, J.; *et al*. Evidence for Nipah virus recrudescence and serological patterns of captive Pteropus vampyrus. *Epidemiol. Infect.* **2011**, 1–10.
76. Bossart, K. Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. *Virology* **2008**, *372*, 357–371.
77. Negrete, O.A.; Chu, D.; Aguilar, H.C.; Lee, B. Single amino acid changes in the nipah and hendra virus attachment glycoproteins distinguish EphrinB2 from EphrinB3 usage. *J. Virol.* **2007**, *81*, 10804–10814.
78. Field, H.; Young, P.; Yob, J.M.; Mills, J.; Hall, L.; Mackenzie, J. The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect.* **2001**, *3*, 307–314.
79. Chua, K.B. Nipah virus outbreak in Malaysia. *J. Clin. Virol.* **2003**, *26*, 265–275.
80. Epstein, J.H.; Abdul Rahman, S.; Zambriski, J.A.; Halpin, K.; Meehan, G.; Jamaluddin, A.A.; Hassan, S.S.; Field, H.E.; Hyatt, A.D.; Daszak, P. Feral cats and risk for Nipah virus transmission. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1178–1179.
81. Mills, J.N.; Alim, A.N. M.; Bunning, M.L.; Lee, O.B.; Wagoner, K.D.; Amman, B.R.; Stockton, P.C.; Ksiazek, T.G. Nipah virus infection in dogs, Malaysia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 950–952.
82. Anonymous Hendra virus, equine - Australia (21): (QL) canine. *ProMed Mail* **2011**, Archive Number: 20110802.2324. Available online at: http://www.promedmail.org/ (access on 4 April 2013).
83. Hayman, D.T.S.; Wang, L.-F.; Barr, J.; Baker, K.S.; Suu-Ire, R.; Broder, C.C.; Cunningham, A.A.; Wood, J.L.N. Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in ghana, west Africa. *PLoS One* **2011**, *6*, e25256.
84. Mathieu, C.; Pohl, C.; Szecsi, J.; Trajkovic-Bodennec, S.; Devergnas, S.; Raoul, H.; Cosset, F.-L.; Gerlier, D.; Wild, T.F.; Horvat, B. Nipah Virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. *J. Virol.* **2011**, *18*, 7863–7881

85. Stachowiak, B.; Weingartl, H.M. Nipah virus infects specific subsets of porcine peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e30855.
86. Field, H.; Schaaf, K.; Kung, N.; Simon, C.; Waltisbuhl, D.; Hobert, H.; Moore, F.; Middleton, D.; Crook, A.; Smith, G.; Daniels, P.; *et al*. Hendra virus outbreak with novel clinical features, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 338–340.
87. Westbury, H.A. Hendra virus disease in horses. *Rev. Off. Int. Epizoot.* **2000**, *19*, 151–159.
88. Parashar, U.D.; Sunn, L.M.; Ong, F.; Mounts, A.W.; Arif, M.T.; Ksiazek, T.G.; Kamaluddin, M.A.; Mustafa, A.N.; Kaur, H.; Ding, L.M.; *et al*. Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 1755–1759.
89. Munster, V.J.; Prescott, J.B.; Bushmaker, T.; Long, D.; Rosenke, R.; Thomas, T.; Scott, D.; Fischer, E.R.; Feldmann, H.; Wit, E. de Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 736.
90. Lo, M.K.; Miller, D.; Aljofan, M.; Mungall, B.A.; Rollin, P.E.; Bellini, W.J.; Rota, P.A. Characterization of the antiviral and inflammatory responses against Nipah virus in endothelial cells and neurons. *Virology* **2010**, *404*, 78–88.
91. Torres-Velez, F.J.; Shieh, W.-J.; Rollin, P.E.; Morken, T.; Brown, C.; Ksiazek, T.G.; Zaki, S.R. Histopathologic and immunohistochemical characterization of Nipah virus infection in the guinea pig. *Vet. Pathol* **2008**, *45*, 576–585.
92. Blackman, M.A.; Woodland, D.L. The narrowing of the CD8 T cell repertoire in old age. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 537–542.
93. Frasca, D.; Blomberg, B.B. Aging impairs murine B cell differentiation and function in primary and secondary lymphoid tissues. *Aging Dis.* **2011**, *2*, 361–373.
94. Kovacs, E.J.; Palmer, J.L.; Fortin, C.F.; Fülöp, T., Jr; Goldstein, D.R.; Linton, P.-J. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 319–324.
95. Müller, U.; Steinhoff, U.; Reis, L.F.; Hemmi, S.; Pavlovic, J.; Zinkernagel, R.M.; Aguet, M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **1994**, *264*, 1918–1921.

© 2013 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 license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

III. Annexe 3 : Chapitre sur les Henipavirus dans un ouvrage sur les Mononegavirales d'importance vétérinaire

3 Hendra and Nipah Viruses

Kévin P. Dhondt and Branka Horvat
International Center for Infectiology Research (CIRI), INSERM: U1111, Lyon, France

3.1 Introduction

Hendra (HeV) and Nipah (NiV) viruses are two of the most dangerous viruses in the world. Their emergence from a zoonotic reservoir in South-east Asia and Oceania caused human outbreaks with fatality rates rising up to 100% among infected people. Due to their high pathogenicity and the lack of appropriate prophylaxis or treatment, HeV and NiV are classified as biosafety level 4 (BSL-4) pathogens. They are also classified as category C potential agents of bioterrorism. The study of these intriguing viruses is therefore particularly restricted and hampered for security reasons.

In 1994, a new virus causing severe respiratory disease in horses was identified in the Brisbane suburb of Hendra, Australia. The Hendra virus was rapidly proved to cause severe illness in humans who had been in close contact with infected horses (Murray *et al.*, 1995). In 1998, in Malaysia, a new disease emerged in pigs, causing large epizootics that were initially thought to be due to Japanese encephalitis virus (JeV). Because many of the people exposed to the porcine epizootic tested negative for JeV, the emergence of a new virus was suggested. In 1999, the Nipah virus was first isolated from a human fatality from the Sungai Nipah village (Mohd Nor *et al.*, 2000). These viruses show features of the *Paramyxoviridae* family but possess particularities that led to the creation of the *Henipavirus* genus, named after the contraction of the two names. Henipaviruses are large-enveloped single-stranded RNA viruses of negative polarity (Fig. 3.1). Their genome is the largest among the *Paramyxoviridae* viruses (≈18.2 kb) and contains six transcriptional units coding for six structural proteins (N, P, M, F, G and F). Within the phosphoprotein (P) gene, the presence of a single editing site allows for the addition of one or two Guanine (G) residues during transcription by the viral polymerase. Translation of edited transcripts results in proteins that share the same amino-terminus as that of P protein but each carries a unique carboxyl-terminus. The protein with the +1 frameshift corresponds to the V protein and the protein with the +2 frameshift is known as the W protein. Another open reading frame within the P gene allows the production of a small protein known as C protein (Eaton *et al.*, 2006). The P, V, W and C proteins were proved to be involved in the inhibition of the immune host response and act as virulence factors (Basler, 2012).

HeV and NiV are both harboured by several species of fruit bats from the *Pteropodidae* family, which range from South-east Asia and Australia to Africa, and better known as flying foxes (Fig. 3.2). These giant bats, displaying a

© CAB International 2013. *Mononegaviruses of Veterinary Importance Vol. I: Pathobiology and Molecular Diagnosis* (ed. M. Munir)

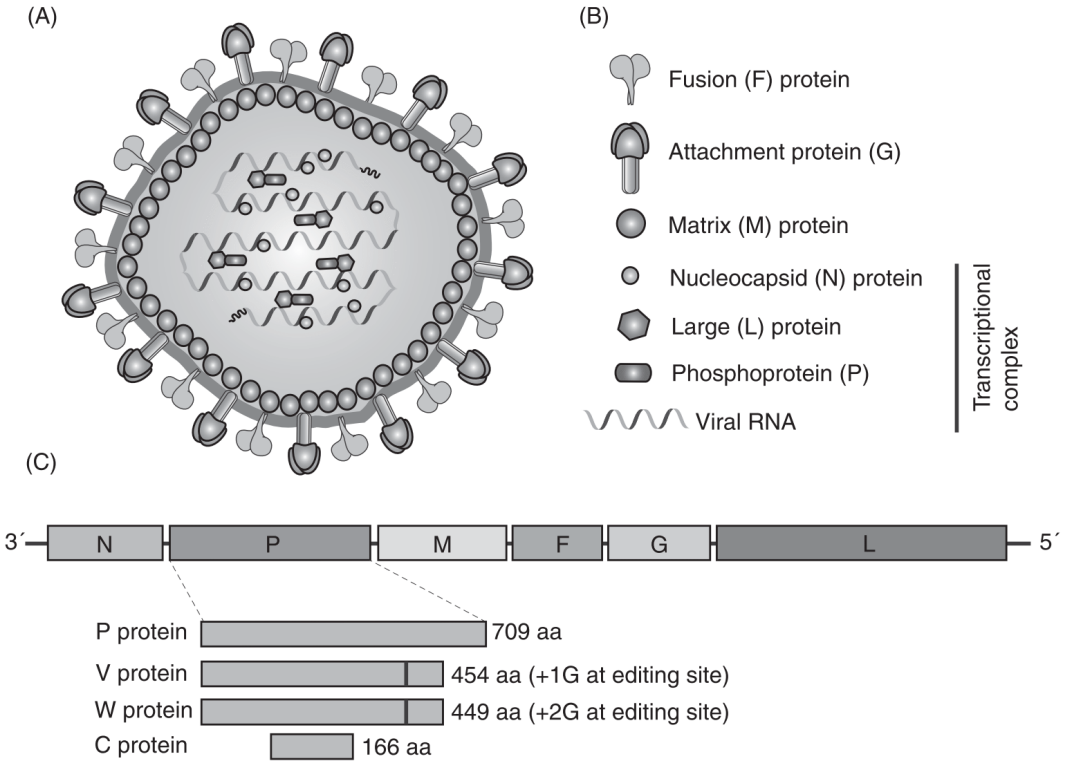


Fig. 3.1. Structure of Henipaviruses and their genome organization. (A, B) Schematic structure of Henipaviruses and arrangement of the viral proteins (C) The negative-sense genomic RNA of Henipaviruses is presented here in the 3′ to 5′ orientation. All genes, except the P gene, are monocistronic. The P gene encodes for three non-structural proteins: V, W and C, which are 454 aa, 449 and 166 aa long, respectively.

wingspan of up to 1.7 m, live in colonies of thousands of individuals and feed mainly on fruits and flowers, which they locate by smell. Once fruit bats were identified as the main reservoir for Henipaviruses, serological studies and immunosurveillance showed the circulation of Henipaviruses among the fruit bat population of the whole South-east Asia and Oceania. Recent studies revealed the circulation of Henipavirus-like viruses in Africa, where clinical cases have not yet being registered. Deforestation and agriculture intensification led to a decrease of bats' natural habitat and represent critical factors responsible for the crossing of the species barrier (Pulliam *et al.*, 2012). In this context, farm and domestic animals such as pigs or horses were more easily exposed to bat droppings, which are the primary source of contamination. Evidence of NiV infection was also found in cats, dogs, horses, cows and goats, but was mainly restricted to dogs for HeV (Geisbert *et al.*, 2012). The respiratory form of the disease in domestic animals, especially in horses and pigs, induces high production of contaminating aerosol particles and allows transmission to humans. Concerning NiV, two other ways of human contamination were discovered in Bangladesh. The first suggests the drinking of raw palm sap contaminated with bat saliva and/or droppings (Salah Uddin Khan *et al.*, 2011) and the second concerns human-to-human transmission through aerosol in the case of close contact with infected patients (Homaira *et al.*, 2010).

3.2 Pathogenesis

3.2.1 Clinical signs

In humans, NiV and HeV show similar clinical symptoms, although much more is known about the pathogenesis of NiV, given

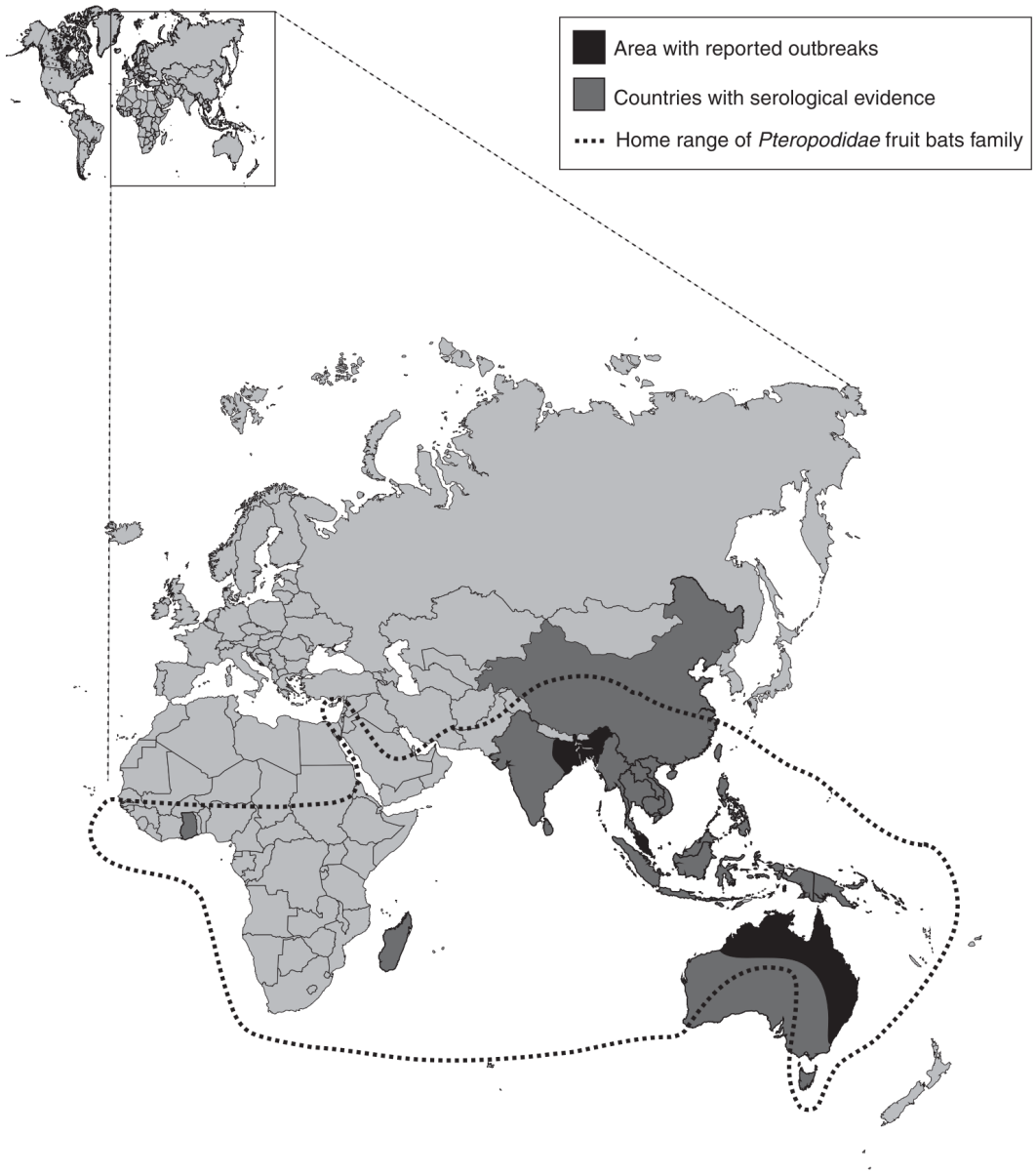


Fig. 3.2. Flying foxes, their distribution and the locations of disease outbreaks caused by Hendra virus and Nipah virus. The geographic distribution of the viruses strongly correlates with the animals' home range.

the larger number of human cases with this virus. After an incubation period of up to 2 weeks, patients develop flu-like symptoms, frequently followed by fatal encephalitis with multiple organ failure. The neurological symptoms may be associated with a pulmonary syndrome. NiV lethality ranges from 40 to 100% and HeV lethality varies with a similar range. Relapse and late-onset disease, even years after first exposure, was documented for both viruses (Wong and Tan, 2012).

In naturally infected animals, and especially in pigs and horses, pulmonary symptoms are more prominent. In pigs infected by NiV, the morbidity rate rises to 100% and the mortality rate varies from 1 to 40%, depending on the age. In many cases, the symptoms appear to be extremely subtle, but in animals that clearly develop clinical

signs, a combination of neurological and respiratory syndrome was observed. In porkers, the respiratory syndrome leads to a harsh non-productive cough, a condition commonly termed 'barking pig syndrome' and is considered to be the first characteristic of the disease. In sows, infection is usually related to sudden death or febrile syndrome (>39.9°C), followed by agitation and head pressing, champing of the mouth, drooling, nystagmus, myoclonus, tetanus-like spasm and seizures, varying degrees of rear leg paresis and pharyngeal muscle paralysis. In piglets, it remains unclear whether the high mortality rate is due to the viral infection itself or the inability of sows to nurse their litter (Mohd Nor *et al.*, 2000). In HeV infected horses, the clinical course of the disease usually lasts less than 36 hours after an incubation period up to 12 days. The disease starts with an acute febrile syndrome (>40°C) followed by an increase in the respiratory and heart rates. The disease progresses to neurological (head pressing, head tilt, ataxia and circling) and respiratory signs (laboured breathing and frothy nasal discharge) (Field *et al.*, 2010). In other domestic species such as dogs and cats, HeV infections are usually asymptomatic, but some infected animals may present similar respiratory and neurological clinical signs as in equines (Mills *et al.*, 2009).

3.2.2 Pathobiology

The life cycle of Henipaviruses is quite similar to other viruses of the *Paramyxoviridae* family. However, they possess specific traits responsible for their high pathogenicity and their potent zoonotic properties. The broad tropism among mammalian species is related to their highly conserved cellular surface receptors, Ephrin B2 and B3, which are broadly distributed in many cell types including neurons and endothelial cells (Maisner *et al.*, 2009). In natural cases, the infection happens mainly via the oronasal route. In this case, the first replication site is located in the epithelium of the oronasal and upper respiratory tract. Then, the virus uses leukocytes as conveyors to reach the second replication site, endothelial cells of the blood vessels, which strengthens the systemic dissemination (Mathieu *et al.*, 2011). Thus, vasculitis is one of the major features observed in tissues as well as thrombosis and parenchymal necrosis. Studies in pigs suggest that Henipaviruses could use two different routes to invade the central nervous system, involving either a breach of the blood–brain barrier or neuroinvasion via cranial nerves. Once it reaches the brain, the virus can spread from neuron to neuron and cause focal destruction of the parenchyma as observed in the MRIs of infected patients. Indeed, Henipaviruses are cytopathogenic viruses that cause cell-to-cell fusion leading to the formation of giant multinucleated cells called syncytia. These syncytia are responsible for the death of cells and the subsequent vascular breach, haemorrhages and necrosis observed in tissues. The inflammation that follows, induced by necrosis and thrombotic areas, leads to the recruitment of leukocytes in the brain that participate in the development of the meningo-encephalitis observed in histology (Wong and Tan, 2012).

The first immune mechanism to be triggered after pathogen entry is the type-I interferon (IFN-I) pathway. After its entry into the host cell, the viral genome is sensed by cytoplasmic RIG-like-receptors (RLR) – such as RIG-I or MDA5 – or by membranous toll-like-receptors (TLR) such as TLR3. This recognition leads to the phosphorylation and activation of several transcription factors, such as interferon regulatory factor 3 (IRF3), that translocate into the nucleus to stimulate the transcription of IFN-I genes. IFN-I is synthesized and released in the extracellular compartment (Fig. 3.3A). The released IFN activates surrounding cells, either by autocrine or paracrine means, expressing the IFN-I receptor (IFNAR). On its activation, IFNAR will phosphorylate signaling molecules, STAT1 and STAT2, leading to their dimerization. The STAT1/STAT2 dimer is translocated to the nucleus, where it activates the transcription of more than 300 IFN-stimulated genes (ISG) responsible for the production of proteins with antiviral properties such as PKR, OAS or Mx (Fig. 3.3B). In addition to their severe

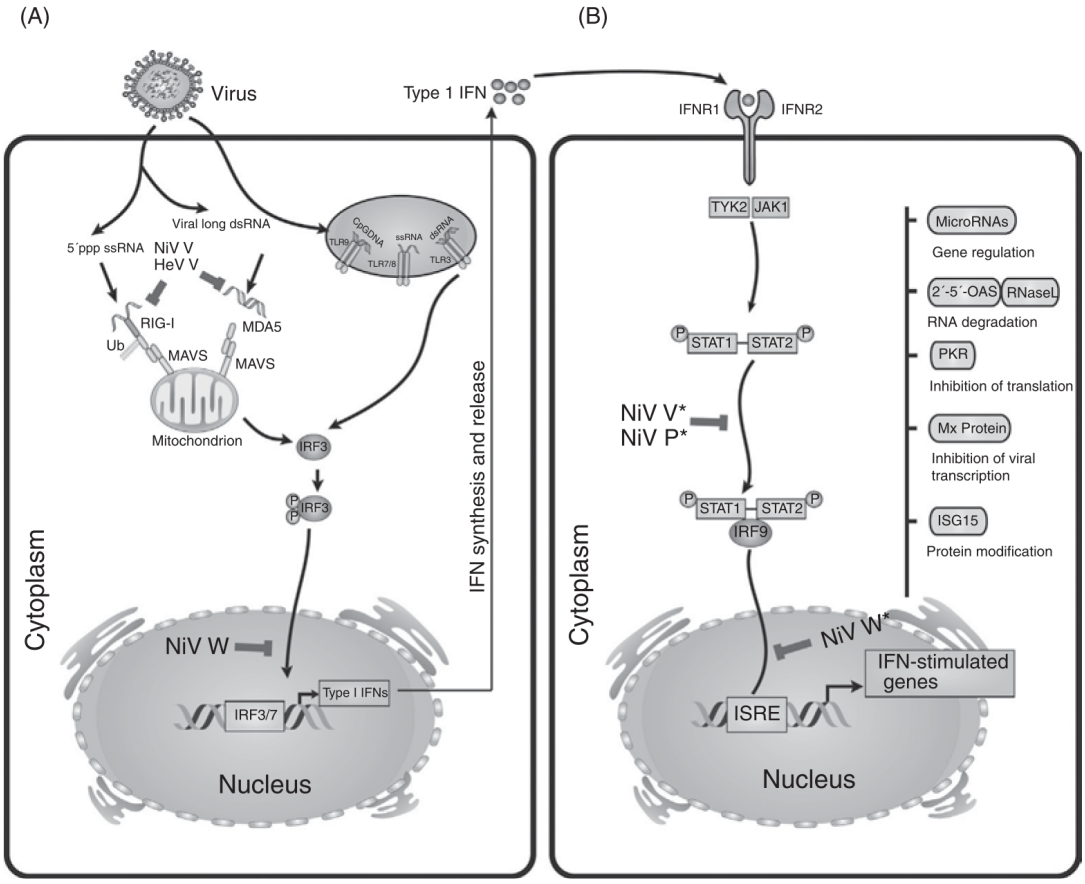


Fig. 3.3. IFN induction pathway and its inhibition by Henipaviruses. (A) Non-structural proteins V and W were shown to interfere with IFN induction at different levels. When overexpressed V, W and P protein could also inhibit IFN signaling (B), although this issue is still not completely resolved and the exact mechanism of complex interactions between Henipavirus and innate immune system remains to be understood. *Effects of viral proteins when overexpressed in cells remains to be confirmed during natural infection.

cytopathic effects, Henipaviruses are able to counteract this fine-tuned mechanism and have evolved strategies to control the IFN pathway. Indeed, the four proteins encoded by the P gene (P, V, W and C) could inhibit IFN-I signaling by different strategies. The V and W proteins have the ability to block the signaling pathway that leads to the activation of IFN-I production in the cytoplasm and in the nucleus, respectively. It seems that, regarding its nuclear localization, the W protein is much more efficient at blocking (Shaw *et al.*, 2005) than the V protein. The V protein was also demonstrated to inhibit the activity of melanoma differentiation-associated protein 5 (Mda5) and laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) helicases, two sensors of dsRNA involved in triggering IFN-I production (Parisien *et al.*, 2009). The precise action of the C protein still remains unknown, although it has been recently shown that it could regulate the production of proinflammatory cytokines in an infected host (Mathieu *et al.*, 2012). When overexpressed in cells, these NiV proteins (P, V and W proteins) are also able to block IFN-I signaling by disturbing the formation and trafficking of STAT1/STAT2 dimers (Basler, 2012). Because STAT plays an important role in the activation of ISG, responsible for the production of antiviral proteins, inactivation of STATs has important consequences on the immune response. However, when

observed in infected cells, the inhibition of IFN-I signaling pathways is not as strong as in overexpression experiments (Virtue *et al.*, 2011). This suggests that in natural conditions the levels of P, V, W and C proteins are not sufficient enough to block IFN-I signaling. Therefore, the precise mechanism used by Henipavirus proteins to counteract the innate immune system remains to be understood.

3.3 Diagnosis

Early diagnosis is a key issue to control disease expansion. Besides the clinical diagnosis, laboratory confirmation is essential, considering the huge health and economic implications that a confirmed case could represent. In 1999, in Malaysia, 1.1 million pigs were slaughtered and 956 farms were destroyed, representing a loss of 126.8 million euros for the Malaysian economy (Hosono *et al.*, 2006) and causing the unemployment of 31,800 people (Lam, 2003). Laboratory diagnoses are ruled by regularly updated guidelines, edited by the World Organization for Animal Health (OIE), in the *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (Anonymous, 2008).

3.3.1 Sampling and submission of samples

The accurate detection of NiV and HeV must be supported by an appropriate sampling procedure, which requires a comprehensive understanding of viral pathobiology. Indeed, the collection site will depend on the time after exposure: sample collection from excretion or tissues for agent identification may be possible during clinical exam or necropsy, whereas blood collection for serological analysis will be relevant 10–14 days after infection. Authorities recommend systematic samples from brain, lungs, kidney and spleen. Samples from mediastinal lymph nodes and, in pregnant animals, uterus, placenta and foetal tissues may also be of great diagnosis value. Samples should be transported at 4°C if they can arrive at the reference laboratory within 48 hours or be frozen using dry ice or liquid nitrogen if the shipping period is longer than 48 hours. However, samples should not be kept at −20°C for a long period.

Because Henipaviruses are classified as BSL-4 microorganisms, their transportation must comply with the International Air Transport Association Dangerous Goods Regulations and samples must be submitted to reference laboratories in specially designed containers.

3.3.2 Molecular diagnosis

Molecular tests give rapid results with very high sensitivity. They can be used for early detection in suspected animal outbreaks as well as for confirmation of human cases. Conventional polymerase chain reaction (PCR) was used with success for many years but was recently superseded by quantitative real-time PCR (qPCR), which is much more sensitive and specific. Several tests and primers have been developed, depending on the technology platform available, and the possibility of discriminating NiV from HeV. These primers are mostly based on the N gene, but also M, P and L genes (Feldman *et al.*, 2009).

Progress in next-generation sequencing (NGS) technologies allows massive sequencing of samples to detect emergence of new strains and control the genetic diversity among host isolates. Such analysis demonstrated that HeV outbreaks do not correlate with a particular isolate but seem to mainly depend on host and environmental factors (Smith *et al.*, 2011).

3.3.3 Virus identification

Virus isolation remains highly advisable to confirm a new outbreak or to identify a new host. However, given the high pathogenicity of both viruses, these experiments have to be carried out in BSL-4 laboratories. To obtain rapid results when such facilities are not available, experiments to

confirm suspicion may be conducted in a BSL-3 laboratory, but highly stringent local guidelines must be applied to protect operators and the population. If cytopathic effects (CPE) compatible with paramyxovirus-like infection are observed, all samples, cultured cells and supernatant have to be transferred to a BSL-4 laboratory. Henipaviruses grow very well to high titre on Vero cells. CPE usually develop after 3 days of culture, even if authorities recommend two passages, 5-days each, to declare the sample negative (Anonymous, 2008). At low multiplicity of infection, CPE are characterized by formation of giant multinucleated cells called syncytia that may contain over 60 nuclei aggregated in the middle or distributed in a ring along the membrane, depending on its maturity (Hyatt *et al.*, 2001). Once the virus has been identified, complementary methods such as qPCR or sequencing should be used for final confirmation and characterization.

Electron microscopy was used in the discovery of HeV (Murray *et al.*, 1995) and remains a helpful tool in diagnosis (Daniels *et al.*, 2001). Direct visualization of viruses is possible in supernatant of infected cells by negative contrast electron microscopy and detection of virus–antibody interaction is feasible by immunoelectron microscopy. This technique allows ultrastructural information to be collected that may help to complete the diagnosis. Ultrastructural studies can also be completed by the grid cell culture method (Hanna *et al.*, 2006) or identification of replicating viruses in thin sections of fixed, embedded cell cultures and infected tissues (Hyatt *et al.*, 2001).

Immunohistochemistry is certainly one of the most useful tests for Henipaviruses because it allows specific staining of the virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. For that reason, it is recommended to sample organs taken at different anatomical levels, especially brain and lungs. The initial immunohistochemical investigations of HeV-infected tissue used a convalescent human serum, but a range of polyclonal and monoclonal antisera are now available. A study of staining efficiency of these different antisera showed that the hyperimmune rabbit sera raised against recombinant N proteins of NiV and HeV were the most effective (Wang and Daniels, 2012). This technique also allows retrospective diagnosis from archival material (Hooper *et al.*, 1996).

3.3.4 Serology

Considering the rapidity and the highly fatal outcome of Henipavirus infection, serological tests are not considered to be a very useful diagnostic tool for identifying cases during early phases of an outbreak. However, such tests may be of particular importance for immunosurveillance and assessment of Henipavirus circulation in wild and domestic animals. Serological tests helped to identify new potential hosts, such as dogs in Henipavirus-infected farms (Mills *et al.*, 2009), and to monitor Henipavirus distribution among its natural reservoir, fruit bats. These analyses also enabled the identification of 'Henipavirus-like' viruses circulating in African fruit bats (Drexler *et al.*, 2009), when neither human nor domestic animal clinical cases have been reported in this region to date.

To confirm the presence of Henipavirus-specific neutralizing antibodies following an exposure to the virus, the virus neutralization test (VNT) is still considered by authorities as the reference standard (Anonymous, 2008). This test needs to be performed in BSL-4 laboratories because it uses live viruses. Serial dilutions of tested sera are incubated in a 96-well plate with 50 plaque forming units of either NiV or HeV at 37°C. After a 1-hour incubation period, Vero cells are added to the wells. Three days later, cultures are read for detection of cytopathic effects (CPE). Sera that completely block development of CPE are declared positive for Henipavirus exposure. However, for rapid screening, another test based on immunostaining was developed to reduce the incubation period to 24 hours (Crameri *et al.*, 2002).

Because it does not require BSL-4 facilities, the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) remains one of the most common tools for immunosurveillance and

epidemiological studies. Antigen is generally produced from non-ionic detergent treatment of infected Vero cells. To control for high levels of nonspecific binding activity, a control antigen from uninfected Vero cells must be used in comparison. The ratio between specific and non-specific binding activity gives the result. Various ELISA tests based on recombinant proteins, including NiV N (Chen *et al.*, 2006), NiV G (Eshaghi *et al.*, 2005) and its soluble form (Wang and Daniels, 2012), truncated forms of NiV and HeV P proteins (Chen *et al.*, 2007), were developed, but their usefulness in field diagnosis remains to be determined. ELISA tests developed by the Centers for Disease Control (CDC, Atlanta, USA), following the Malaysian outbreaks of NiV, allow not only for detection of IgG by indirect ELISA but also IgM by capture ELISA. However, such tests have a major drawback due to their suboptimal specificity. Indeed, the specificity of the indirect NiV ELISA was shown to be 98.4% (Ong *et al.*, 2000). During a NiV outbreak situation, this specificity is satisfactory enough because a high proportion of pigs are infected and the goal of the test is to identify infected farms. However, in the absence of an outbreak, a positive test should lead to immediate and drastic countermeasures to control the spread of the virus. In this case, the number of false positives would be unacceptable and result in dramatic waste. For that reason, all ELISA positive samples have to be confirmed by VNT in accredited BSL-4 laboratories.

The use of pseudotyped viruses represents a good alternative in order to avoid BSL-4 laboratory testing. They are genetically engineered viruses belonging to BSL-1 or BSL-2 groups that express either HeV or NiV envelope glycoproteins. They allow VNT to be performed in a BSL-2 laboratory, which increases the number of laboratories that may get an access to such tests. Currently, several pseudotyped systems have been developed for NiV. The first system, published in 2009, uses a recombinant VSV expressing NiV F and G on viral envelope and luciferase as the reporter molecule (Tamin *et al.*, 2009). The specificity appeared to be relatively good (94–100%) but sensitivity was not convincing enough for diagnosis application. The same year, a second VSV pseudotyped with NiV F and G, which expresses the green fluorescent protein (GFP) as a reporter molecule, was proposed (Kaku *et al.*, 2009). In this system, quantification was performed by either fluorescence measurement or GFP-expressing cell count. This system demonstrates sensitivity at least equal to conventional VNT. A third pseudotyped virus, using HIV lentivirus as vector and luciferase and GFP as the reporter molecules, was developed in 2010 (Khetawat and Broder, 2010). Although it provides information on virus–host interaction, its suitability to detect neutralizing antibodies in diagnosis was not assessed. In addition, another system based on murine leukemia virus bearing both NiV G and NiV F proteins with GFP as reporter gene was developed in Lyon, France (Mathieu *et al.*, 2011), and is currently being tested as a potential diagnostic tool. The last reported system was published in 2012 and is based on a second-generation pseudotyped VSV expressing the secreted alkaline phosphatase (SEAP) as the reporter molecule (Kaku *et al.*, 2012). The major improvement of this reporter is that neutralization titre can be easily obtained from measurement of SEAP activity in supernatant using a common ELISA plate reader. This system appears to be as precise as conventional VNT but only needs 2 µl of serum compared with the 50 µl used in conventional VNT. Thus, it allows significant quantities of valuable serum to be spared, increased throughput for diagnosis and experiments to be performed in a BSL-2 laboratory. This method with high sensitivity and specificity is not yet validated for definitive diagnosis but could be valuable on the front line.

The Luminex-based binding test was developed in 2007 with the major advantage that it does not require live cell culture and can be done in a standard laboratory, without any biocontainment (Bossart *et al.*, 2007). Soluble HeV and NiV G (sG) proteins were coated on two beads with distinctive fluorescent spectra. A predetermined number of each type of beads was mixed with serial dilutions of test sera. After an incubation

period of 30 minutes, bound antibodies were revaluated by addition of biotinylated A and G proteins followed by streptavidin/phycoerythrin. The final fluorescence measurement was performed using a Bio-Plex Protein Array System (BioRad, USA). Pseudo-neutralization assays are possible by replacing biotinylated A and G proteins with a biotinylated soluble ephrin-B2 molecule, known as the natural partner of HeV-G and NiV-G proteins. A very high sensitivity and the good specificity of this technique, associated with its innocuousness, places the Luminex assay as one of the best ways to conduct mass Henipavirus serosurveillance. However, this test does not replace the established reference protocol in serological tests for Henipaviruses: ELISA tests confirmed by VNT (Daniels *et al.*, 2001).

3.4 Prophylactic and Therapeutic Perspectives

3.4.1 Prophylaxis

Prophylaxis is currently the major way to control Henipavirus infections even if medical prophylaxis is still at an experimental level. Because exposure to infectious bat droppings is the major source of contamination, the most efficient prophylaxis method is still environmental. It is very difficult to control deforestation in these regions; however, avoiding the overlap between orchards and pig-pens in Malaysia was a good measure to prevent the re-emergence of the disease. In Bangladesh, where the major contamination source is consumption of palm sap, the use of a bamboo skirt to cover the collection site and make it inaccessible to bats significantly reduced the risk of contamination (Nahar *et al.*, 2010). However, covering each tree is a time-consuming process and this method, although it is currently the best existing prophylaxis in Bangladesh, is not used regularly.

Sanitary prophylaxis is also very efficient but usually implies that an outbreak has already been identified. It consists of a massive awareness-raising campaign in the concerned population about good hygiene practice. For example, during the Malaysian outbreak, the recommendations were broadcast through mass media such as television, radio, schools and newspapers. Malaysian authorities also published posters, leaflets and booklets in various languages to inform the population at risk. They also created a website and a hotline dedicated to providing information to the general public (Chua, 2010). Because Henipaviruses are enveloped viruses, they are very sensitive to detergent. Intensive use of soap and detergent is a cost-effective measure to reduce possible infection in people through hand washing and washing tools (knives, wheelbarrow, vehicles and medical instruments) in contact with infectious materials. For people who could be accidentally exposed to infectious particles, disposable long-sleeved overalls, gloves, masks, protective glasses and boots is highly recommended.

Medical prophylaxis against Henipaviruses mostly consists of vaccines. Some vaccines are under development for animals. The research on live recombinant vaccines gave first results in 2004 with a recombinant vaccinia virus expressing either NiV F or G proteins (Guillaume *et al.*, 2004). However, even if the protection of golden hamsters was clearly demonstrated, the use of such vaccine vector in humans is unlikely. For livestock, a vaccine candidate using recombinant canarypox virus (ALVAC) expressing either NiV F or G glycoproteins was tested on pigs in 2006. This vaccine elicited a good neutralizing antibody titre and prevented disease and virus shedding in vaccinated animals (Weingart *et al.*, 2006). Research is ongoing for a similar vaccine against HeV in horses. In comparison with live attenuated vaccines, subunit immunogen-based vaccines are a more suitable option for vaccine development, especially in humans. They are simple to make, safe concerning infection risk and relatively quick to implement. A vaccine using a soluble form of NiV or HeV G protein, combined with the appropriate adjuvant (Montanide, Quil A and DEAE-Dextran), showed very good results in cats (Mungall *et al.*, 2006), ferrets (Pallister *et al.*, 2011)

and more recently in African green monkeys (Broder *et al.*, 2012). The HeV-sG subunit was licensed by a multinational animal health company and should be commercially available in 2013 for horses. The next challenge in vaccine development is to implement a method that allows serological differentiation of infected from vaccinated animals.

3.4.2 Treatment

Considering the current small annual number of human cases, development of efficient treatments seems to be a more suitable option than production of a human vaccine. In the initial Malaysian outbreak of 1998, ribavirin, a ribonucleoside analog with broad antiviral activity, was used on 140 patients (Chong *et al.*, 2001). Compared with the patients who were admitted before availability of this drug or who refused the treatment, mortality in ribavirin-treated patients was 36% less. However, laboratory experiments on animal models, such as golden hamster, did not confirm the efficiency of ribavirin in the treatment of Henipavirus infection (Georges-Courbot *et al.*, 2006; Freiberg *et al.*, 2010) and ribavirin did not prove effective in the treatment of HeV-infected patients (Playford *et al.*, 2010). Until now, interferon, a commercially available antiviral drug with broad activity, was not considered a good candidate because NiV and HeV were known to inhibit the interferon pathway. However, recently it has been shown that, in the context of human cell infection, Henipaviruses are able to block interferon production but not signaling (Virtue *et al.*, 2011). Such results indicate a therapeutic potential of interferon as a post-exposure treatment.

To compensate for the lack of appropriate drugs, many strategies have been developed. One of them consists of using peptides derived from C-terminal heptad repeat regions of a paramyxovirus F glycoprotein. These peptides are able to inhibit the fusion process between the viral envelope and the membrane of the target cell. Concerning Henipaviruses, the HR-peptides that proved most efficient are derived from another paramyxovirus, the human parainfluenza virus type 3 (hPIV3). The *in vivo* efficiency of this peptide was enhanced by sequence optimization and adjunction of a cholesterol tag that increased the capacity of the peptide to reach the central nervous system where the virus produces most damage (Porotto *et al.*, 2010). Such peptides represent a good therapeutic approach for treating people before encephalitic manifestations.

An original attempt to decrease viral load was done with protocells. These are small nanoporous silica beads enveloped by a lipid bilayer and bearing a Henipavirus receptor, ephrinB2 (Porotto *et al.*, 2011). Circulating virus is attracted to the protocells decoy and the fusion mechanism is triggered, which prevents the virus from infecting host cells. Despite the ingenuity of this system, the use of protocells in infected patients may not be as relevant as expected because of the low amount of free-circulating virus.

Passive immunization is currently the most achieved therapeutic strategy. The proof-of-concept that immunotherapy could prevent Henipavirus infection was rapidly established in the hamster model. The first evidence of passive protection against NiV was shown with monospecific NiV G and NiV F polyclonal antibodies produced in hamsters using recombinant vaccinia viruses. Two intraperitoneal administrations of this serum, 1 hour before challenge and 24 hours after infection, allowed the survival of 100% of treated hamsters (Guillaume *et al.*, 2004). Murine monoclonal antibodies (mAbs) against NiV F and NiV G were next developed as ascitic fluid preparations and tried in the hamster model (Guillaume *et al.*, 2006). When used in the same conditions as hamster polyclonal antibodies, murine mAbs showed similar results and protected 100% of treated animals. When the mAbs treatment was done 24 hours after challenge, the protection level decreased to 50%. Similar studies were done with HeV challenge and proved to be efficient when administered before challenge, thus demonstrating the good cross-reaction of murine mAbs targeted

against NiV F protein (Guillaume *et al.*, 2009). Altogether, these studies proved that prophylactic passive immunotherapy directed against Henipavirus glycoproteins is possible. However, such antibodies would answer much better the real field need if they could be given after Henipavirus exposure. The development of such antibodies, suitable for humans, was allowed by recombinant antibody methods. This technology uses a large naïve human phage display combinatorial antibody library that allows isolation of Fab fragments of single chain variable fragments. Neutralizing human mAbs specific against the Henipavirus G glycoproteins were identified (Zhu *et al.*, 2006) and two of them were converted to full-length human IgG1 antibodies. One of these recombinant antibodies, m102.4, possesses excellent inhibitory activity against NiV but also a potent cross-reactivity towards HeV with 50% inhibitory concentrations below 0.04 µg/ml for NiV and 0.6 µg/ml for HeV (Zhu *et al.*, 2008). Such encouraging results led to application tests in animal models. First, the human mAb 102.4 was assessed in the ferret model either 24 hours before or 10 hours after NiV challenge (Bossart *et al.*, 2009). All animals from the post-treated group survived, whereas 2 of 3 animals from the pre-treated group died, suggesting the rapid clearance of mAb 102.4 antibodies in ferrets. Nevertheless, this study is the first to report an effective post-exposure treatment for Henipavirus infection. In accordance with requirements for use of drugs in humans, m102.4 antibody was tested in a second animal species, the African green monkey. Animals were challenged with HeV and treated with a 20 mg/kg dose of m102.4 beginning at 10 hours, 24 hours or 72 hours post infection. They received a second identical dose 48 hours after the first treatment. All the treated animals survived the challenge, even if animals of the 72-hour treatment group experienced some transient neurological problems. There was no evidence of HeV-specific pathology in organs of any treated animal at the end of the protocol (40 days post infection). Although very high dose of mAb was required for the injection, these studies reveal its high potential as a post-exposure treatment for Henipaviruses.

3.5 Conclusions

Infectious diseases are a key concern in public opinion. Emergence of new viruses such as H5N1 influenza virus or SARS coronavirus raises the threat of deadly pandemics. Among these emergent viruses, Henipaviruses attract particular attention among members of the *Paramyxovirus* family, because they possess a high zoonotic potential associated with one of the highest fatality rates observed in infectious diseases. Economic consequences of an outbreak are very serious and the estimated loss subsequent to the initial Malaysian outbreak was estimated to be over US$170 million. Because there is currently no available efficient prophylaxis or treatment, study of these viruses is restricted to the few BSL-4 laboratories existing in the world. Such restrictions slow down scientific breakthroughs, but many trails have been blazed since the first emergence of HeV in 1996. Early diagnosis associating clinical and laboratory assessment is the key issue for their control. Considering that 70% of emerging or re-emerging infectious diseases possess a zoonotic or vector-borne origin, the necessity to gather competencies around the 'One World One Health Initiative' is a critical factor to enhance public health efficacy. In this context, field veterinarians, physicians as well as researchers represent the keystones of the surveillance programme and will allow synergistic and rapid expansion in scientific knowledge. Within this context, Henipaviruses will represent a significant challenge for the coming years and research on these viruses should improve public safety towards potential pandemics or bioterrorist attack.

Acknowledgements

The work was supported by INSERM and ANR and KD was supported by DGA and INSERM.

References

Anonymous (2008) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Mammals, Birds, and Bees*, 6th edn. OIE, Paris.

Basler, C.F. (2012) Nipah and Hendra virus interactions with the innate immune system. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 359, 123–152.

Bossart, K.N., McEachern, J.A., Hickey, A.C., Choudhry, V., Dimitrov, D.S., Eaton, B.T. and Wang, Lin-Fa (2007) Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *Journal of Virological Methods* 142, 29–40.

Bossart, K.N., Zhu, Z., Middleton, D., Klippel, J., Crameri, G., Bingham, J., McEachern, J.A., Green, D., Hancock, T.J., Chan, Y.-P., Hickey, A.C., Dimitrov, D.S., Wang, Lin-Fa and Broder, C.C. (2009) A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute Nipah virus infection. *PLoS Pathogens* 5(10) DOI: 10.1371/journal.ppat.1000642.

Broder, C.C., Geisbert, T.W., Xu, K., Nikolov, D.B., Wang, Lin-Fa, Middleton, D., Pallister, J. and Bossart, K.N. (2012) Immunization strategies against henipaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 359, 197–223.

Chen, J.-M., Yu, M., Morrissy, C., Zhao, Y.-G., Meehan, G., Sun, Y.-X., Wang, Q.-H., Zhang, W., Wang, Lin-Fa and Wang, Z.-L. (2006) A comparative indirect ELISA for the detection of henipavirus antibodies based on a recombinant nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli. Journal of Virological Methods* 136, 273–276.

Chen, J.-M., Yaiw, K.C., Yu, M., Wang, Lin-Fa, Wang, Q.-H., Crameri, G. and Wang, Z.-L. (2007) Expression of truncated phosphoproteins of Nipah virus and Hendra virus in *Escherichia coli* for the differentiation of henipavirus infections. *Biotechnology Letters* 29, 871–875.

Chong, H.T., Kamarulzaman, A., Tan, C.T., Goh, K.J., Thayaparan, T., Kunjapan, S.R., Chew, N.K., Chua, K.B. and Lam, S.K. (2001) Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Annals of Neurology* 49, 810–813.

Chua, K.B. (2010) Risk factors, prevention and communication strategy during Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malaysian Journal of Pathology* 32, 75–80.

Crameri, G., Wang, L.F., Morrissy, C., White, J. and Eaton, B.T. (2002) A rapid immune plaque assay for the detection of Hendra and Nipah viruses and anti-virus antibodies. *Journal of Virological Methods* 99, 41–51.

Daniels, P., Ksiazek, T. and Eaton, B.T. (2001) Laboratory diagnosis of Nipah and Hendra virus infections. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* 3, 289–295.

Drexler, J.F., Corman, V.M., Gloza-Rausch, F., Seebens, A., Annan, A., Ipsen, A., Kruppa, T., Müller, M.A., Kalko, E.K.V., Adu-Sarkodie, Y., Oppong, S. and Drosten, C. (2009) Henipavirus RNA in African bats. *PLoS One* 4, e6367.

Eaton, B.T., Broder, C.C., Middleton, D. and Wang, Lin-Fa (2006) Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nature Reviews Microbiology* 4, 23–35.

Eshaghi, M., Tan, W.S., Chin, W.K. and Yusoff, K. (2005) Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. *Journal of Biotechnology* 116, 221–226.

Feldman, K.S., Foord, A., Heine, H.G., Smith, I.L., Boyd, V., Marsh, G.A., Wood, J.L.N., Cunningham, A.A. and Wang, L.-F. (2009) Design and evaluation of consensus PCR assays for henipaviruses. *Journal of Virological Methods* 161, 52–57.

Field, H., Schaaf, K., Kung, N., Simon, C., Waltisbuhl, D., Hobert, H., Moore, Frederick, Middleton, D., Crook, A., Smith, G., Daniels, P., Glanville, R. and Lovell, D. (2010) Hendra virus outbreak with novel clinical features, Australia. *Emerging Infectious Diseases* 16, 338–340.

Freiberg, A.N., Worthy, M.N., Lee, B. and Holbrook, M.R. (2010) Combined chloroquine and ribavirin treatment does not prevent death in a hamster model of Nipah and Hendra virus infection. *Journal of General Virology* 91, 765–772.

Geisbert, T.W., Feldmann, H. and Broder, C.C. (2012) Animal challenge models of henipavirus infection and pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* DOI: 10.1007/82_2012_208.

Georges-Courbot, M.C., Contamin, H., Faure, C., Loth, P., Baize, S., Leyssen, P., Neyts, J. and Deubel, V. (2006) Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1768–1772.

Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Georges-Courbot, M.C., Lefeuvre, A., Marianneau, P., Chua, K.B., Lam, S.K., Buckland, R., Deubel, V. and Wild, T.F. (2004) Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *Journal of Virology* 78, 834–840.

Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Grosjean, I., Georges-Courbot, M.C., Deubel, V., Buckland, R. and Wild, T.F. (2006) Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters. *Journal of Virology* 80, 1972–1978.

Guillaume, V., Wong, K.T., Looi, R.Y., Georges-Courbot, M.C., Barrot, L., Buckland, R., Wild, T.F. and Horvat, B. (2009) Acute Hendra virus infection: analysis of the pathogenesis and passive antibody protection in the hamster model. *Virology* 387, 459–465.

Hanna, J.N., McBride, W.J., Brookes, D.L., Shield, J., Taylor, C.T., Smith, I.L., Craig, S.B. and Smith, G.A. (2006) Hendra virus infection in a veterinarian. *The Medical Journal of Australia* 185, 562–564.

Homaira, N., Rahman, M., Hossain, M.J., Epstein, J.H., Sultana, R., Khan, M.S.U., Podder, G., Nahar, K., Ahmed, B., Gurley, E.S., Daszak, P., Lipkin, W.I., Rollin, P.E., Comer, J.A., Ksiazek, T.G. and Luby, S.P. (2010) Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007. *Epidemiology and Infection* 138, 1630–1636.

Hooper, P.T., Gould, A.R., Russell, G.M., Kattenbelt, J.A. and Mitchell, G. (1996) The retrospective diagnosis of a second outbreak of equine morbillivirus infection. *Australian Veterinary Journal* 74, 244–245.

Hosono, H., Kono, H., Ito, S. and Shirai, J. (2006) T6-1.3.1 – Economic impact of nipah virus infection outbreak in Malaysia. International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE) proceedings, ISVEE 11: *Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Cairns, Australia (Theme 6 - Global response and emerging diseases: Wildlife disease session), p. 324.

Hyatt, A.D., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Wise, T.G. and Hengstberger, S.G. (2001) Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes and Infection* 3, 297–306.

Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, G.A, McEachern, J.A., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Fukushi, S., Broder, C.C., Yamada, A., Inoue, S. and Wang, L.F. (2009) A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *Journal of Virological Methods* 160, 7–13.

Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, G.A., Barr, J.A., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Fukushi, S., Broder, C.C., Yamada, A., Inoue, S. and Wang, L.F. (2012) Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus antibodies: sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase. *Journal of Virological Methods* 179, 226–232.

Khetawat, D. and Broder, C.C. (2010) A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system. *Virology Journal* 7, 312.

Lam, S.-K. (2003) Nipah virus – a potential agent of bioterrorism? *Antiviral Research* 57, 113–119.

Maisner, A., Neufeld, J. and Weingartl, H. (2009) Organ- and endotheliotropism of Nipah virus infections in vivo and in vitro. *Thrombosis and Haemostasis* 102, 1014–1023.

Mathieu, C., Pohl, C., Szecsi, J., Trajkovic-Bodennec, S., Devergnas, S., Raoul, H., Cosset, F.-L., Gerlier, D., Wild, T.F. and Horvat, B. (2011) Nipah virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. *Journal of Virology* 18, 85, 7863–7871.

Mathieu, C., Guillaume, V., Volchkova, V.A., Pohl, C., Jacquot, F., Looi, R.Y., Wong, K.T., Legras-Lachuer, C. Volchkov, V.E., Lachuer, J. and Horvat, B. (2012) Nonstructural Nipah virus C protein regulates both the early host proinflammatory response and viral virulence. *Journal of Virology* in press.

Mills, J.N., Alim, A.N.M., Bunning, M.L., Lee, O.B., Wagoner, K.D., Amman, B.R., Stockton, P.C. and Ksiazek, T.G. (2009) Nipah virus infection in dogs, Malaysia, 1999. *Emerging Infectious Diseases* 15, 950–952.

Mohd Nor, M.N., Gan, C.H. and Ong, B.L. (2000) Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 19, 160–165.

Mungall, B.A., Middleton, D., Crameri, G., Bingham, J., Halpin, K., Russell, G., Green, D., McEachern, J., Pritchard, L.I., Eaton, Bryan T., Wang, L.F., Bossart, K.N. and Broder, C.C. (2006) Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *Journal of Virology* 80, 12,293–12,302.

Murray, K., Rogers, R., Selvey, L., Selleck, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Hooper, P. and Westbury, H. (1995) A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerging Infectious Diseases* 1, 31–33.

Nahar, N., Sultana, R., Gurley, E.S., Hossain, M.J. and Luby, S.P. (2010) Date palm sap collection: exploring opportunities to prevent Nipah transmission. *EcoHealth* 7, 196–203.

Ong, B.L., Daniels, P.W., Bunning, M., Jamaluddin, A., White, J., Muniandy, M., Olson, J. and Chang, K.W. (2000) A surveillance programme for the detection of pig herds exposed to nipah virus infections in Peninsula Malaysia. International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics (ISVEE) proceedings, ISVEE 9: *Proceedings of the 9th Symposium of the International Society*

for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, Colorado, USA (Surveillance and monitoring session), p. 263.

Pallister, J., Middleton, D., Wang, Lin-Fa, Klein, R., Haining, J., Robinson, R., Yamada, M., White, J., Payne, J., Feng, Y.-R., Chan, Y.-P. and Broder, C.C. (2011) A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine* 29, 5623–5630.

Parisien, J.-P., Bamming, D., Komuro, A., Ramachandran, A., Rodriguez, J.J., Barber, G., Wojahn, R.D. and Horvath, C.M. (2009) A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2. *Journal of Virology* 83, 7252–7260.

Playford, E.G., McCall, B., Smith, G., Slinko, V., Allen, G., Smith, I., Moore, F., Taylor, C., Kung, Y.H. and Field, H. (2010) Human Hendra virus encephalitis associated with equine outbreak, Australia, 2008. *Emerging Infectious Diseases* 16, 219–223.

Porotto, M., Rockx, B., Yokoyama, C.C., Talekar, A., DeVito, I., Palermo, L.M., Liu, J., Cortese, R., Lu, M., Feldmann, H., Pessi, A. and Moscona, A. (2010) Inhibition of Nipah virus infection in vivo: targeting an early stage of paramyxovirus fusion activation during viral entry. *PLoS Pathogens* 6, e1001168.

Porotto, M., Yi, F., Moscona, A. and LaVan, D.A. (2011) Synthetic protocells interact with viral nanomachinery and inactivate pathogenic human virus. *PLoS ONE* 6, e16874.

Pulliam, J.R.C., Epstein, J.H., Dushoff, J., Rahman, S.A., Bunning, M., Jamaluddin, A.A., Hyatt, A.D., Field, H.E., Dobson, A.P. and Daszak, P. (2012) Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *Journal of the Royal Society, Interface/the Royal Society* 9, 89–101.

Salah Uddin Khan, M., Hossain, J., Gurley, E.S., Nahar, N., Sultana, R. and Luby, S.P. (2011) Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: implications for preventing Nipah virus transmission. *EcoHealth* 7, 517–525.

Shaw, M.L., Cardenas, W.B., Zamarin, D., Palese, P. and Basler, C.F. (2005) Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *Journal of Virology* 79, 6078–6088.

Smith, I., Broos, A., de Jong, C., Zeddeman, A., Smith, C., Smith, G., Moore, Fred, Barr, J., Crameri, G., Marsh, G., Tachedjian, M., Yu, M., Kung, Y.H., Wang, L.F. and Field, H. (2011) Identifying Hendra virus diversity in pteropid bats. *PLoS ONE* 6, e25275.

Tamin, A., Harcourt, B.H., Lo, M.K., Roth, J.A., Wolf, M.C., Lee, B., Weingartl, H., Audonnet, J.-C., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2009) Development of a neutralization assay for Nipah virus using pseudotype particles. *Journal of Virological Methods* 160, 1–6.

Virtue, E.R., Marsh, G.A. and Wang, L.F. (2011) Interferon signaling remains functional during henipavirus infection of human cell lines. *Journal of Virology* 85, 4031–4034.

Wang, L.F. and Daniels, P. (2012) Diagnosis of henipavirus infection: current capabilities and future directions. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 359, 179–196.

Weingartl, H.M., Berhane, Y., Caswell, J.L., Loosmore, S., Audonnet, J.-C., Roth, J.A. and Czub, M. (2006) Recombinant Nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *Journal of Virology* 80, 7929–7938.

Wong, K.T. and Tan, C.T. (2012) Clinical and pathological manifestations of human henipavirus infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 359, 95–104.

Zhu, Z., Dimitrov, A.S., Bossart, K.N., Crameri, G., Bishop, K.A., Choudhry, V., Mungall, B.A., Feng, Y.-R., Choudhary, A., Zhang, M.-Y., Feng, Y., Wang, L.F., Xiao, X., Eaton, B.T., Broder, C.C. and Dimitrov, D.S. (2006) Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. *Journal of Virology* 80, 891–899.

Zhu, Z., Bossart, K.N., Bishop, K.A., Crameri, G., Dimitrov, A.S., McEachern, J.A., Feng, Y., Middleton, D., Wang, L.F., Broder, C.C. and Dimitrov, D.S. (2008) Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody. *Journal of Infectious Diseases* 197, 846–853.

IV. Annexe 4 : Liste des publications et participations à des congrès

A. Publications en 1er auteur sur le sujet de la thèse :

1. Dans les revues internationales à comité de lecture

K. P. Dhondt*, C. Mathieu*, M. Chalons, J. M. Reynaud, A. Vallve, H. Raoul, and B. Horvat, “Type I interferon signaling protects mice from lethal Henipavirus infection,” J Infect Dis., Oct. 2012. *Contributions égales.

K. P. Dhondt and B. Horvat, “Henipavirus Infections: Lessons from Animal Models,” Pathogens, vol. 2, no. 2, pp. 264–287, Apr. 2013.

2. Chapitres dans des ouvrages

K. P. Dhondt and B. Horvat, “Hendra and Nipah viruses.” in Mononegavirales of Veterinary Importance - Pathobiology and Molecular Diagnosis, CABI, 2013, pp. 38–51.

B. Autres publications sur le sujet de la thèse :

1. Dans les revues internationales à comité de lecture

G. Caignard, M. Lucas-Hourani, K. P. Dhondt, J.-L. Labernardière, T. Petit, Y. Jacob, B. Horvat, F. Tangy, and P.-O. Vidalain, “The v protein of tioman virus is incapable of blocking type I interferon signaling in human cells,” PLoS ONE, vol. 8, no. 1, p. e53881, 2013.

C. Mathieu, K. P. Dhondt, M. Châlons, S. Mély, H. Raoul, D. Gerlier, R. R. Vivès and B. Horvat, Heparin-mediated inhibition of Henipavirus infection, En révision chez mBio.

C. Articles en préparation :

Kévin P. Dhondt, Jacquot F., Kalinke U., van Rooijen N., Gerlier D., Raoul H., Horvat B., “Dissection of the components of immune response controlling highly pathogenic Nipah virus infection”.

François Enchéry*, Kévin P. Dhondt*, Chloé Journo, Louis-Marie Bloyet, Renaud Mahieux, Denis Gerlier, Branka Horvat. *contributions égales. “Disruption of NFκB signaling by Nipah virus non-structural proteins”.

D. Communications effectuées par le doctorant:

1. Dans des colloques internationaux

Communication orale American Society of Virology congress, Fort Collins, CO – Juin 2014 : K. P. Dhondt, U. Kalinke, H. Raoul, and B. Horvat « Role of Innate Immunity in the Control of Nipah Virus Infection »

Présentation de poster au European Congress of Virology, Lyon – Septembre 2013 : K. P. Dhondt, C. Mathieu, M. Chalons, and B. Horvat "New transgenic mouse model revealed crucial role of type I interferon during early stages of Henipavirus infection"

Présentation de poster au EMBO/LACI , Marseille – Janvier 2013 - Dr Jekyll and Mr Hyde: The Macrophage in Inflammation and Immunity : K. P. Dhondt, C. Mathieu, M. Chalons, J. M. Reynaud and B. Horvat "Mice are protected from lethal Nipah virus infection by macrophages and efficient interferon type 1 signaling"

2. Dans des colloques nationaux

Communication orale à Journées Francophones de Virologie, Paris – Mars 2014 : K. P. Dhondt, U. Kalinke, H. Raoul, and B. Horvat « Rôle de la réponse immunitaire dans le contrôle de l'infection par le virus Nipah chez la souris»

Auteur : DHONDT, Kévin, Pierre, Louis

Résumé : Etude des mécanismes de haute pathogénicité des Henipavirus

Les virus Nipah et Hendra sont des paramyxovirus zoonotiques émergents hautement pathogènes du genre *Henipavirus*. Ils sont capables d'infecter un large spectre d'hôtes incluant notamment la chauve-souris frugivore (réservoir naturel), le porc et l'homme. Etant donné leur très forte pathogénicité chez l'homme et en l'absence de traitements curatifs ou prophylactiques efficaces, ces virus doivent être manipulés dans un laboratoire de classe P4. Dans une première partie, nous étudierons les effets de composés glyco-amino-glycanes sur la dissémination des Henipavirus au sein de l'hôte ainsi que leur potentielle application en tant que traitement. Dans une seconde partie, nous attacherons à comprendre les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et le virus. Afin de mieux étudier ces interactions, nous utiliserons une approche basée sur l'utilisation de souris déficientes pour certaines voies de l'immunité. En effet, bien que les récepteurs cellulaires au virus soient fonctionnels chez la souris, celle-ci est résistante à l'infection par voie intrapéritonéale. Nous avons analysé la susceptibilité au virus Nipah (NiV) de souris privées de différentes voies du système immunitaire inné et adaptatif. Les résultats obtenus permettent d'envisager certaines lignées de ces souris comme nouveaux modèles animaux pour l'étude de l'immunopathogénèse du NiV. Enfin, cette étude suggère que le système interféron de type I joue un rôle crucial dans la limitation de la propagation virale vers le cerveau et que les lymphocytes T sont nécessaires à la complète élimination du virus. Les macrophages jouent, quant à eux, un rôle central et indispensable, à l'interface entre système inné et adaptatif. Enfin, nous aborderons les prémices d'un projet visant à identifier les différences d'interactions au niveau moléculaire entre les protéines non-structurales du virus et les protéines du système immunitaire inné (particulièrement de la voie de signalisation de NF-κB) chez l'Homme et la souris afin de voir s'il se dégage des différences d'interactions pouvant expliquer les différences de pathogénie. Ces travaux ont donc permis de mieux caractériser les interactions entre le pathogène et le système immunitaire de l'hôte, de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme entier. Néanmoins, les mécanismes précis de ces interactions restent à élucider et permettront certainement de mieux comprendre la haute pathogénicité des Henipavirus.

Abstract : Study of mecanisms of high pathogenicity of Henipaviruses

Hendra and Nipah viruses are lethal zoonotic paramyxoviruses belonging to *Henipavirus* genus. They infect a wide range of mammals from its natural host, fruit bats, to humans. As they are highly pathogenic and as there are neither vaccines nor treatments, they require manipulation in BSL4-Laboratories. In this thesis, we first studied the role of glycoaminoglycans compounds on the dissemination of Henipaviruses within the host as well as their potential use in prophylaxis. Secondly, we tried to understand host/pathogen interactions in immunity. For this purpose, we took advantage of the fact that, despite they express the functional viral entry receptor, mice are resistant to Henipaviruses infection. So, we analyzed the susceptibility to Henipaviruses infection of different mice strains deleted for some immune pathways. Results revealed that type-I interferon and T cells are both critical to eradicate the virus. Macrophages were also identified as a key component of the immune response, orchestrating both innate and adaptive immunity. Finally, as type-I interferon was proved to be critical, we focused on molecular interactions between viral non structural proteins and proteins of the NF-κB signaling pathways, that are potent inducers of type-I interferon production. Altogether, these results helped to characterize interactions between the immune system and the pathogen, from molecular to full organism scale. However, the precise mecanisms of these interactions remain to be discovered and to help to a better understanding of the high pathogenicity of Henipaviruses.