



HAL
open science

Génétique de la résistance à la fièvre de la vallée du Rift : Rvfs2 confère une tolérance à l'hépatite

Ruben Leandro de Araujo Paredes Batista

► To cite this version:

Ruben Leandro de Araujo Paredes Batista. Génétique de la résistance à la fièvre de la vallée du Rift : Rvfs2 confère une tolérance à l'hépatite. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066473 . tel-01293650

HAL Id: tel-01293650

<https://theses.hal.science/tel-01293650>

Submitted on 25 Mar 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.

Université Pierre et Marie Curie

Complexité du Vivant

Unité de Génétique fonctionnelle de la souris

Génétique de la résistance à la fièvre de la Vallée du Rift

Rvfs2 confère une tolérance à l'hépatite

Par Rúben Leandro BATISTA

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Jean-Jacques PANTHIER

Présentée et soutenue publiquement le 25 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Mme Juliette RIQUET , Directrice de Recherche, INRA Toulouse	Rapporteur
M. Frédéric MORINET , Professeur, Université Paris VII	Rapporteur
Mme Claire DANE , Docteur, Service de Santé des Armées, DGA	Examineur
Mme Marie FLAMAND , Chargée de Recherche, Institut Pasteur	Examineur
M. Philippe MARIANNEAU , Directeur de Recherche, ANSES Lyon	Examineur
M. Eric SEBOUN , Professeur, Université Paris VI	Examineur
M. Jean-Jacques PANTHIER , Professeur, Université Paris VI	Examineur

Université Pierre et Marie Curie

Complexité du Vivant

Unité de Génétique fonctionnelle de la souris

Génétique de la résistance à la fièvre de la Vallée du Rift

Rvfs2 confère une tolérance à l'hépatite

Par Rúben Leandro BATISTA

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Jean-Jacques PANTHIER

Présentée et soutenue publiquement le 25 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Mme Juliette RIQUET , Directrice de Recherche, INRA Toulouse	Rapporteur
M. Frédéric MORINET , Professeur, Université Paris VII	Rapporteur
Mme Claire DANE , Docteur, Service de Santé des Armées, DGA	Examineur
Mme Marie FLAMAND , Chargée de Recherche, Institut Pasteur	Examineur
M. Philippe MARIANNEAU , Directeur de Recherche, ANSES Lyon	Examineur
M. Eric SEBOUN , Professeur, Université Paris VI	Examineur
M. Jean-Jacques PANTHIER , Professeur, Université Paris VI	Examineur

*À mes parents,
cette thèse vous est entièrement dédiée*

*Pai, Mãe,
esta tese vos é inteiramente dedicada*

REMERCIEMENTS

Le philosophe Sénèque remarqua autrefois à propos des bienfaits que « *celui qui montre de la gratitude en recevant un bienfait a déjà acquitté une partie de l'obligation qu'il lui impose* ».

Quant à moi, je ne pense pas pouvoir, un jour, acquitter tout ce que j'ai reçu des différentes personnes que j'ai rencontrées durant mes trois ans de doctorat. Mais si Sénèque, dans sa sagesse, eut raison, je m'efforcerai ci-dessous d'être à la hauteur de votre générosité et bienveillance.

Je commencerai par l'évident : ce chemin, ce travail et, enfin, cette thèse n'auraient pas pu voir le jour sans le soutien incessant de mon directeur de thèse, Jean-Jacques PANTHIER. Je te remercie Jean-Jacques de m'avoir accepté dans l'équipe, de m'avoir confié ce projet ambitieux et guidé tout au long du doctorat. Parce que tu as toujours été disponible pour m'écouter, pour ton indulgence et patience dans les innombrables fois où j'ai été difficile, pour ton inestimable contribution à mon agrandissement en tant que personne et scientifique, je te suis et serai toujours infiniment reconnaissant. Merci.

Dominique, je ne pense pas pouvoir exprimer avec justesse, par des mots, ce que tu m'as apporté. Ton aide, tes conseils, tes mots de soutien, ton amitié. Puisque tu as toujours été présente à mes côtés dans les bons et mauvais moments, dans les réussites et dans les échecs, cette thèse est aussi la tienne.

Aline, merci d'être une amie exceptionnelle, une collègue, une comparse. Merci d'avoir écouté mes histoires, mes plaintes, mes projets et expériences, mes idées et pensées, mes idéologies politiques ou mes traductions latines... tous les jours, pendant trois ans, autour d'un verre, d'un café ou d'un *BigMac*. Merci pour ton temps, tes mots, ton attention.

Karima, que serais-je sans toi ? Merci.

Diana, merci d'avoir été toujours présente, pour ton amitié et ton soutien.

Je tiens à remercier Gabriella pour les « pauses-café », derrière Metchnikoff, qui maintes fois ont sauvé ma journée ; mes portugaises préférées, Rosa et Inês, qui ont toujours su m'animer avec une « *Sagres* » dans les moments les plus pénibles de la thèse ; mon « *pote* » Menelik et

mes amies Mathilde et Emmanuelle pour les discussions, les déjeuners à la cantine, les sorties ; mes stagiaires, Marine et Clémentine, pour leur patience, leur grande responsabilité et les résultats expérimentaux qu'elles ont obtenus et qui ont fait avancer le sujet davantage.

Alexandra, pour ton amitié, certes, récente, mais précieuse, *Большое спасибо*.

Diogo, mon frère adopté, merci de ton soutien moral et de ton aide logistique à rassembler cette thèse.

Je remercie également l'ensemble de l'Unité de Génétique fonctionnelle de la souris – Jean, Michel, Xavier, Sandrine, Laetitia, Jin, Aurélien, Jérôme, Léonard, Rashida – qui m'ont chaleureusement intégré dans le laboratoire et qui, par les nombreuses discussions et réunions intellectuellement stimulantes, ont contribué au présent travail ; ainsi que nos collaborateurs, Magali, Carole, Marie Flamand et Gregory Jouvion. Sans votre aide, dévouement et persévérance, ce travail avec le VFVR n'aurait pas été possible.

Je ne peux me garder d'adresser un mot spécial de remerciement à Isabelle qui avec la célérité et habileté qui la caractérisent m'a souvent aidé à gérer la bureaucratie inhérente au doctorat. À Denis qui, en s'associant à mon sujet de thèse, m'a aidé à caractériser le génotype des souris et garantira désormais la continuation du projet. À Satoko qui avec amitié et gentillesse m'a introduit à la génétique de la Souris et de laquelle j'ai hérité le projet.

Je témoigne de ma reconnaissance à Jean-Louis Guénet qui a toujours porté un grand intérêt à mon travail. Je vous remercie pour tous les échanges scientifiques, linguistiques et, particulièrement, sur l'Histoire de la France et du Portugal. *Obrigado*.

Mme Alizon Morel, je vous remercie de m'avoir fait découvrir la beauté de la langue de Molière. Si j'ai réussi à écrire cette dissertation en français, vous en êtes la coupable. *Gratias maximas*.

Katy, ma chère sœur, tout simplement, merci de faire partie de ma vie et d'être mon pilier.

Et enfin, les derniers, mais loin d'être les moindres, je remercie mes parents pour tout leur sacrifice et leur dévotion, leur amour inconditionnel. Il y a 5 ans, vous m'avez accordé la possibilité de faire mes études universitaires à Paris, cette thèse est votre rétribution. J'espère, de tout mon cœur, que vous serez fiers du résultat.



AVANT-PROPOS

Avant de vous engager dans un voyage à travers ma thèse de sciences, cher lecteur, rappelons-nous ensemble les prémices de la connaissance scientifique.

Remémorons-nous les sumériens, astronomes ingénieux de l'aube de la civilisation, qui nommèrent les étoiles et les planètes, qui en décrivirent les mouvements et les cycles. Contemplons les égyptiens, pionniers de la géométrie antique, qui construisirent les pyramides et le sphinx de Gizeh. Admirons les Grecs, les fondateurs de la logique et inventeurs de la méthode scientifique ; la patrie de la raison, s'il y en eut une, fut la leur. Et pourtant, les uns virent dans les astres les signes des dieux et accordèrent aux proportions des facultés magiques ; les autres vécurent leurs vies filées par les Moires¹ implacables dans un monde où mythe et réalité furent indiscernables.

Il y eut ce temps où mythologie et sciences n'étaient qu'une seule et même discipline, où l'observation du réel ne pouvait être comprise que par la connaissance profonde d'une volonté divine. Aurait-ce été vraiment un paradoxe ? Finalement, mythologie et sciences naquirent de la même capacité inventive, du même questionnement, d'une même quête d'interprétation du monde qui nous entoure : ce sont les traits de l'humanité de l'Homme.

François Jacob, prix Nobel de physiologie ou médecine, écrivit en 1981 à ce sujet : « [mythes et sciences] *fournissent tous deux à l'esprit humain une certaine représentation du monde et des forces qui l'animent. Ils délimitent tous les deux le champ du possible* »²

Platon, quelque critique qu'il en soit, resta fidèle à la tradition homérique lorsqu'il établit une sorte de parenté entre les deux : pour lui, ce sont les dieux qui inspirèrent aux hommes le désir du savoir, la science ne fut qu'un don de l'Olympe.

« *Prométhée dérobe le savoir technique d'Héphaïstos et d'Athéna, ainsi que le feu (...) et c'est ainsi qu'il en fait présent à l'homme. De cette manière l'homme était donc en possession du savoir qui concerne la vie (...)* »³

¹ Les Moires étaient, chez les anciens, la personnification du Destin. Par leur travail de filage, dont le fil était une métaphore de la vulnérabilité et incertitude de la vie, elles devenaient maîtresses de la destinée de l'Homme.

² François Jacob, *Le Jeu des Possibles*, 1981

Les fils d'*Hellen*⁴ désireux de graver dans l'Histoire les savoirs que Prométhée leur offrit, créèrent donc un nouveau style d'expression écrite, le *διάλογος*⁵ (dialogue). Quand il traitait de questions purement mythologiques et était présenté devant un public, ils l'appelèrent « *Théâtre* » ; si, au contraire, il ne fût que véhicule de connaissances et de l'argumentation d'une thèse, Platon l'appellerait « *Dialectique* », Cicéron « *Rhétorique* ».

À une époque où les sociétés occidentales semblent conquises par l'amnésie des valeurs et des accomplissements de tels savants, je me propose, par la présente thèse, de leur rendre hommage en la divisant à l'image des textes rhétoriques gréco-romains:

1. Partie I : *Exordium* (Préambule)

Commentaire sur l'intérêt et la pertinence de la thèse.

2. Partie II : *Narratio* (Introduction)

Explication détaillée de la nature du sujet traité.

3. Partie III : *Divisio* (Objectifs)

Exposition de la thèse qui sera développée par la suite.

4. Partie IV : *Confirmatio* (Résultats)

Description des stratégies et observations expérimentales.

5. Partie V : *Refutatio* (Discussion)

Interprétation critique des observations.

Discussion de leurs limites et perspectives.

6. Partie VI : *Peroratio* (Conclusion)

Synthèse des principales idées développées au long de la thèse.

Qui plus est, deux histoires seront exposées en parallèle : celle des travaux scientifiques menés au long des trois dernières années et celle du mythe gréco-romain de Prométhée, le Titan qui fit don du raisonnement scientifique à l'Homme. La première, l'objet de ce travail, fera naturellement le corps du texte. La dernière sera racontée par ordre chronologique dans les pages de couverture ou rapportée au travail de la thèse par des citations introduisant les chapitres.

³ Platon, *Protagoras*, 321d

⁴ *Hellen* fut le géniteur mythologique des quatre tribus helléniques : Eoliens, Doriens, Achéens et Ioniens.

⁵ *διάλογος* = litt. "à travers le discours"

Mythe et science se croiseront à la fin dans une analogie si singulière et inattendue que j'ai été persuadé d'écrire cet avant-propos.

Je vous laisse la découvrir par vous-mêmes!

*« L'Océanine, Clymène, la vierge aux fines chevilles,
Fut épousée par Japet, qui monta sur la couche commune.
Elle enfanta (...) le fourbe, vif, Prométhée (...)
« Fils de Japet, expert en ruse à nul autre semblable,
Noble ami, tu n'as pas oublié l'artifice perfide. »
Il se tut, le grand Zeus courroucé, aux pensées immortelles.
Mais le fils vaillant de Japet sut tromper sa puissance
Et déroba l'immense éclat de la flamme inlassable
Dans la fêrule creuse : il sentit dans son cœur la morsure,
Zeus qui tonne très haut ! »⁶*

⁶ Hésiode, *La Théogonie*, 507-568

TABLE DES MATIÈRES

<i>EXORDIUM OU PREAMBULE</i>	21
L'ÉMERGENCE DES FIEVRES HEMORRAGIQUES	23
<i>NARRATIO OU INTRODUCTION</i>	25
QU'EST-CE QUE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT ?	27
1 L'AGENT PATHOGENE	27
2 LA TRANSMISSION	33
LE VFVR, D'OU VIENT-IL ?	37
1. L'ÉPIDÉMIOLOGIE : LES ORIGINES ET L'EXPANSION	37
2. L'ÉPIDÉMIOLOGIE : LES CONSÉQUENCES SOCIO-ÉCONOMIQUES	40
LE VFVR, OU VA-T-IL ?	43
1. LES RISQUES POUR L'OCCIDENT	43
QUELLES MALADIES PROVOQUE LE VFVR ?	47
1. LA PATHOGENESE CHEZ L'HOMME	47
2 LA PATHOGENESE CHEZ LE BETAIL	50
LES MODELES ANIMAUX : QUE CONNAIT-ON ?	53
1 LE MOUTON : UN MODELE DE VACCINATION ANIMALE	53
2 LE MACAQUE RHESUS : UN MIROIR DE L'HOMME	53
3 LES RONGEURS : LE MODELE PAR EXCELLENCE	54
POURQUOI LA SOURIS ?	61
1 LA SOURIS ET LES MALADIES INFECTIEUSES	61
2 UN MODELE ADAPTE A L'ÉTUDE DE LA GENÉTIQUE DE LA FVR	62
QUELLES SONT LES ORIGINES DE LA SOURIS ?	65
1 LE GENRE <i>MUS</i>	65
LIGNEES CLASSIQUES OU LIGNEES SAUVAGES ?	69
1 LES LIGNEES CLASSIQUES DE SOURIS DE LABORATOIRE	69
2 LES LIGNEES SAUVAGES	72
<i>DIVISIO OU OBJECTIFS</i>	73
<i>CONFIRMATIO OU RESULTATS</i>	77
L'IDENTIFICATION DES <i>QUANTITATIVE TRAIT LOCI</i> (QTL)	81
1 RESULTATS PRINCIPAUX	81
LA CARACTERISATION DE LA PATHOGENESE DE LA FVR	91
1 RESULTATS PRINCIPAUX	91
LA DISSECTION GENÉTIQUE DE L'INTERVALLE <i>Rvfs2</i>	117
1 <i>Rvfs2</i> MODULE LA SENSIBILITE DES SOURIS A UNE INFECTION PAR LE VFVR	117
2 L'INTERVALLE GENOMIQUE <i>Rvfs2</i> COMPORTE PLUS DE 400 GENES	119
3 LA DERIVATION DE TROIS LIGNEES CONSANGUINES SOUS-CONGENIQUES POUR L'INTERVALLE <i>Rvfs2</i>	121
4 LES SOURIS C.MBT-[<i>D11Mit69</i>] PRESENTENT UNE SENSIBILITE PRECOCE AU VFVR	123
5 LA DISSECTION GENÉTIQUE DU SEGMENT COMPRIS ENTRE <i>D11Mit69</i> ET LE TELOMERE	129
LA RECHERCHE DE GENES CANDIDATS	141
1 L'IDENTIFICATION DES VARIANTS DE STRUCTURE	141
2 L'IDENTIFICATION DE VARIANTS DE REGULATION	152
3 LES GENES CANDIDATS	155
4 LES GENES <i>FASN</i> ET <i>Cd7</i> SONT ASSOCIES AUX MOTS-CLES « VIRUS » ET « LIVER »	157

REFUTATIO OU DISCUSSION	159
LA SENSIBILITE DES SOURIS A LA FVR EST UN CARACTERE COMPLEXE ET POLYGENIQUE	161
1 L'ETUDE DE CARTOGRAPHIE DE QTLs	161
2 LA DIFFICULTE D'IDENTIFIER DES FACTEURS GENETIQUES	163
LE LOCUS <i>Rvfs2</i> CONTROLE UNE TOLERANCE A L'INFECTION PAR LE VFVR	169
1 LES MECANISMES DE REPOSE AUX INFECTIONS	169
2 LA TOLERANCE	170
3 TOLERANCE VS. RESISTANCE	173
FASN EST LE MEILLEUR GENE CANDIDAT POUR LA SENSIBILITE AU VFVR	175
1 LA LISTE DE GENES CANDIDATS	175
2 LES GENES CANDIDATS	177
PERORATIO OU CONCLUSION	183
BIBLIOGRAPHIE	187

TABLE DES ABRÉVIATIONS

- ❖ **ALT** : Alanine AminoTransférase
- ❖ **AMPK** : AMP-activated protein kinase
- ❖ **ANSM**: Agence Nationale de Sureté du Médicament
- ❖ **ARNc** : ARN complémentaire viral
- ❖ **ARNv** : ARN viral
- ❖ **AST** : Aspartate AminoTransférase
- ❖ **BALB/c** : BALB/cByJ
- ❖ **Cas9** : CRISPR associated protein 9
- ❖ **CC** : Collaborative Cross
- ❖ **CDC** : Centers for Disease Control and Prevention
- ❖ **CD7** : Cluster of Differentiation
- ❖ **CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- ❖ **CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- ❖ **dbSNP** : database SNP
- ❖ **DO** : Diversity Outbred
- ❖ **FASN** : Fatty acid synthase
- ❖ **FVR** : Fièvre de la Vallée du Rift
- ❖ **GATK** : Genome Analysis Toolkit
- ❖ **GWAS** : Genome-wide association studies
- ❖ **hRLuc** : humanized Renilla Luciferase
- ❖ **INDELs** : Insertion/Deletion
- ❖ **LPS** : lipopolysascharides
- ❖ **LOD** : Logarithm of Odds
- ❖ **MBT** : MBT/Pas
- ❖ **MEFs** : Mouse Embryonic Fibroblasts
- ❖ **MegaMUGA** : Mega Mouse Universal Genotype Array
- ❖ **MOTs** : Micro-Organismes et Toxines hautement pathogènes
- ❖ **MUGA** : Mouse Universal Genotype Array
- ❖ **NCBI** : National Center for Biotechnology Information
- ❖ **NIAID** : National Institute of Allergy and Infectious Diseases
- ❖ **OMS** : Organisation Mondiale de Santé
- ❖ **PFUs** : Plaque Forming Units
- ❖ **PKR** : Protein Kinase RNA-activated
- ❖ **QTL** : Quantitative Trait Locus
- ❖ **RNF213** : RiNg Finger protein 21
- ❖ **ROS** : Reactive Oxygen Species
- ❖ **Rvfs** : Rift Valley Fever susceptibility
- ❖ **SIFT** : Sorting Intolerant From Tolerant
- ❖ **Skive** : Skive/EiJ
- ❖ **SNPs** : Single Nucleotide Polymorphisms
- ❖ **UCSC** : Université de Californie, Santa Cruz
- ❖ **UTRs** : UnTranslated Regions
- ❖ **VFVR** : Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift
- ❖ **WF** : Wistar-Furth

EXORDIUM

OU

PRÉAMBULE

« [Prométhée :] *Écoutez plutôt les misères des mortels
et comment d'enfants qu'ils étaient auparavant
j'ai fait des êtres doués de raison et de réflexion* »⁷

⁷ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 436-484

« Mais il ne fit aucun compte des malheureux mortels ;
il voulait même en faire disparaître la race toute entière pour en faire naître une nouvelle. »⁸

L'ÉMERGENCE DES FIÈVRES HÉMORRAGIQUES

Le 30 septembre 2014, l'agence gouvernementale américaine *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) a annoncé le premier cas de maladie à virus Ebola diagnostiqué hors d'Afrique (CDC, 2014). Cela faisait déjà 6 mois que l'épidémie la plus meurtrière d'Ebola ravageait la côte occidentale africaine, ayant touché plus de 7 000 personnes à travers 5 pays dont la moitié sont décédés (WHO, 2014). Ce jour-là, les Etats-Unis ont intégré la liste des pays concernés et l'Occident a compris que « Ebola » n'était plus un problème de l'Afrique de l'Ouest et constituait un danger de Santé Publique pour le monde. Fin juin 2015, l'OMS a rapporté plus de 11 000 décès dans 7 pays (WHO, 2015a) à un moment où de nouveaux cas sont survenus dans des pays déclarés précédemment indemnes de l'épidémie.

Pourtant, le virus Ebola n'est pas récent. Il a été identifié il y a 40 ans, en 1976, lors d'une première épidémie en Afrique Centrale (Muyembe-Tamfum et al., 2012). Il a été isolé et étudié en laboratoire et la fièvre hémorragique qu'il provoque classée parmi les maladies tropicales négligées (MacNeil and Rollin, 2012). Avant 2014, rien ne laissait prévoir cette épidémie et le monde n'était pas préparé à l'affronter.

Depuis le début de l'épidémie, la lutte contre Ebola a connu de grands progrès et la quantité de ressources disponibles pour combattre l'épidémie a considérablement augmenté. Néanmoins, d'autres fièvres hémorragiques provoquées par des virus aussi meurtriers et endémiques de l'Afrique subsaharienne restent dans l'ombre, peu connus des décideurs politiques et du public, malgré la menace que ces maladies représentent pour la santé mondiale (WHO, 2005, WHO, 2003).

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) fait partie des fièvres hémorragiques originaires de l'Afrique subsaharienne et largement négligées. L'agent pathogène qui en est responsable, le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR), est un virus transmis par plusieurs groupes différents de moustiques (Fontenille et al., 1998, Moutailler et al., 2008, Pepin et al., 2010) et

⁸ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 197-246

actuellement présent sur la majorité du continent africain (Chevalier et al., 2010). Le virus est capable d'infecter un grand nombre d'espèces de mammifères dont l'Homme et le bétail, provoquant des épidémies et épizooties saisonnières avec de lourdes conséquences économiques, sociales et de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de Santé, la FVR est une des maladies infectieuses émergentes (WHO, 2015b) qui affectent majoritairement les populations pauvres et marginalisées n'ayant pas accès aux soins de santé de base. À l'heure actuelle, aucun traitement ni vaccin humain efficace n'a été développé. Pour toutes ces raisons, il faut un vrai investissement dans la recherche sur cette maladie afin d'éradiquer la FVR des pays touchés et d'éviter des épidémies de proportions similaires à celle d'Ebola.

NARRATIO

OU

INTRODUCTION

« (...) lorsqu'un homme tombait malade, il n'avait aucun secours à espérer (...) et il dépérissait faute de remèdes, jusqu'au jour où je [Prométhée] montrai aux hommes à mélanger doux médicaments qui écartent toutes les maladies »⁹

⁹ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 436-484

« [Io :] *Qui es-tu ? Qui es-tu, malheureux, toi (...) qui as nommé le mal que les dieux m'ont envoyé, ce taon dont la piqûre me fait courir le monde ?* »¹⁰

QU'EST-CE QUE LA FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT ?

1 L'agent pathogène

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) appartient au genre des *Phlebovirus* (Elliott, 1997), l'un des 5 genres de la famille Bunyaviridae – *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus* et *Tospovirus*. Cette famille de virus, établie en 1975, est composée de plus de 350 membres ayant des caractéristiques morphologiques, moléculaires et des propriétés antigéniques communes (Bishop et al., 1980, Fenner, 1975, Porterfield et al., 1975).

À l'exception des Hantavirus, tous les Bunyavirus sont des arbovirus (*arthropode-borne virus*) ou virus transmis par des arthropodes. Ils comptent de nombreux agents pathogènes pour l'Homme, pour les animaux et pour les plantes (genre *Tospovirus*). Puisque plusieurs de ces virus sont responsables d'infections humaines sévères, voire fatales – la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (genre *Nairovirus*), la fièvre de la Vallée du Rift, l'encéphalite de Californie (genre *Orthobunyavirus*) –, le groupe des Bunyavirus est d'un grand intérêt pour la Recherche Médicale (Weaver and Barrett, 2004, Weaver and Reisen, 2010).

1.1 Le génome viral

Comme tous les Bunyavirus, le VFVR possède un génome divisé en trois segments indépendants d'ARN simple brin de polarité négative ou ambisens (Giorgi et al., 1991, Muller et al., 1994). Les segments, qui codent les 4 protéines structurales caractéristiques des Bunyavirus (**Figure 1**), sont nommés selon leur taille en nucléotides : un segment L (*large*) – le segment le plus long –, un segment M (*medium*) – le segment de taille intermédiaire – et un segment S (*small*) – le segment le plus court. Le segment L code l'ARN polymérase virale, le

¹⁰ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 586-628

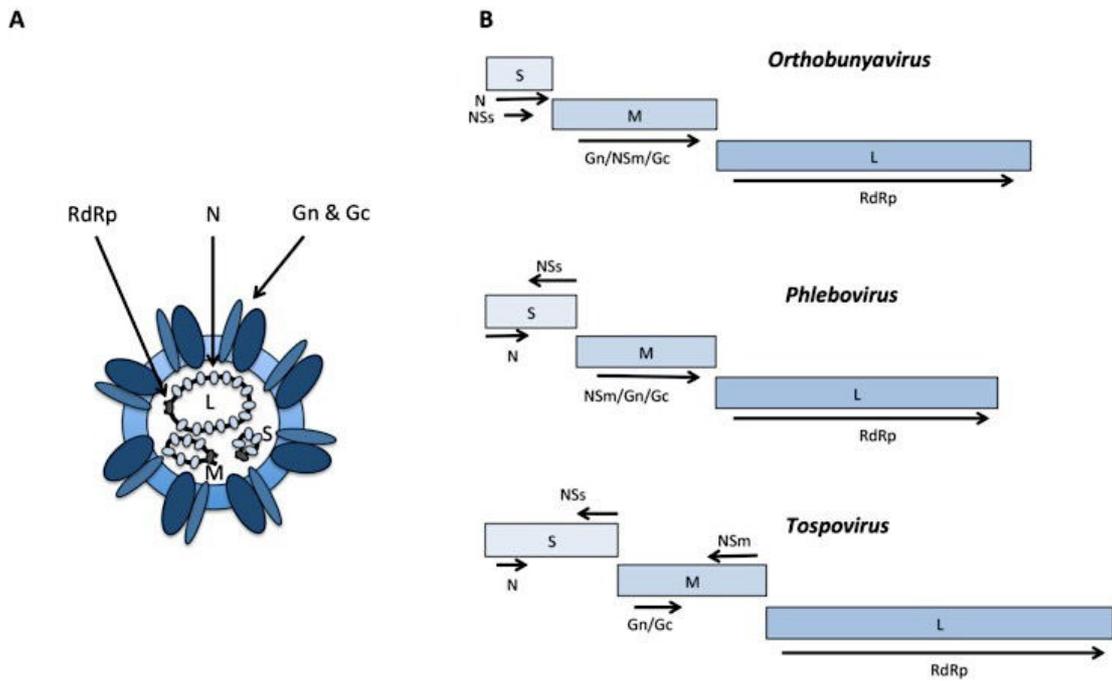


Figure 1: Structure du virion et organisation génétique des bunyavirus.

- (A) Le virion contient trois segments d'ARN (L, M et S) qui sont recouverts de nombreuses copies de la protéine N.
- (B) Représentation schématique des phases ouvertes de lecture et protéines codées dans le génome de trois genres de bunyavirus (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Tospovirus*). Les flèches indiquent la position et l'orientation des phases ouvertes de lecture. La RdRp (*RNA dependent RNA polymerase*) correspond à la phase ouverte de lecture codant l'ARN polymérase virale. (Eifan et al., 2013)

segment M les précurseurs des glycoprotéines de l'enveloppe et le segment S code la protéine N de la nucléocapside (Struthers et al., 1984). De plus, les segments M et S du VFVR contiennent chacun une phase ouverte de lecture qui code une protéine non structurale, NSm et NSs, respectivement. Tandis que les segments L et M présentent une polarité négative (Muller et al., 1994), le segment S est le seul à utiliser une stratégie ambisens : l'orientation négative du gène codant N et l'orientation positive du gène codant NSs (Giorgi et al., 1991). Chacun des trois segments contient deux régions non traduites (UTRs, *UnTranslated Regions*), en position 5' et 3', qui jouent le rôle de promoteurs de la transcription et réplication virale. Les UTRs exposent des extrémités complémentaires et conservées qui confèrent une forme circulaire fermée aux trois segments génomiques (Walter and Barr, 2011).

1.2 Le virion

Des études de microscopie électronique sur le VFVR ont décrit des virions de forme polygonale, ayant une symétrie icosaédrique d'un diamètre de 80 à 120 nm. Les virions sont formés de 2 structures macromoléculaires (**Figure 1**) : l'enveloppe, plus extérieure – qui est composée d'une bicouche lipidique contenant les glycoprotéines virales transmembranaires, Gn et Gc – et la ribo-nucléocapside, à l'intérieur – composée des trois molécules d'ARN génomique entièrement recouvertes de nombreuses copies de la protéine N (Freiberg et al., 2008, Sherman et al., 2009, von Bonsdorff and Pettersson, 1975). Toujours à l'intérieur de l'enveloppe, se localisent plusieurs copies de l'ARN polymérase virale responsable de l'initiation de la transcription primaire du virus lorsqu'il rentre dans les cellules-hôtes (Pepin et al., 2010).

1.3 Le cycle viral

La transcription

Dès que le virus infecte la cellule-hôte par l'intermédiaire des récepteurs de la surface cellulaire et par la fusion des membranes lipidiques, l'ARN polymérase virale, libérée dans le cytoplasme cellulaire (Filone et al., 2006), initie la phase primaire de la transcription (Bouloy et al., 1990, Jin and Elliott, 1993, Patterson et al., 1984). L'activité de l'ARN polymérase est stimulée par l'interaction entre l'enzyme, les segments du génome viral et des molécules d'ARNm cellulaires qui sont ensuite utilisées en tant qu'amorces d'initiation de la

transcription. La transcription permet la synthèse d'ARNs messagers viraux qui sont ensuite traduits dans les ribosomes de la cellule-hôte pour produire les protéines virales nécessaires à la formation des virions.

La réplication

La réplication commence par une phase de synthèse d'ARNs de polarité positive complémentaires du génome viral (ARNc ou antigénome). Contrairement à l'initiation de la transcription, la réplication se déroule de façon autonome car l'ARN polymérase virale ne nécessite pas d'oligonucléotides cellulaires pour son activité répliquative. Une fois les segments de polarité positive synthétisés, ils sont ensuite utilisés en tant que matrices de la production des copies du génome viral qui seront ensuite encapsidées (Bouloy and Weber, 2010, Muller et al., 1994). Le mécanisme moléculaire responsable de la transition entre la transcription et la réplication n'est pas encore bien connu (Bouloy and Weber, 2010).

L'encapsidation

Alors que les ARNs messagers synthétisés à partir des segments L et S sont traduits par les ribosomes cytoplasmiques, les protéines transmembranaires Gn et Gc codées par le segment M sont produites dans les ribosomes associés au réticulum endoplasmique. Grâce à des signaux peptidiques et à des glycosylations spécifiques de Gn, les deux protéines sont transportées ensemble dans les membranes des vésicules cellulaires et en direction de l'appareil de Golgi où leur accumulation entraîne la formation des enveloppes virales (Bird et al., 2009, Gerrard and Nichol, 2002, Wasmoen et al., 1988). L'interaction entre les protéines de l'enveloppe intégrées dans les membranes du Golgi et le complexe cytoplasmique formé par la protéine N (Liu et al., 2008) et les segments du génome viral déclenche l'encapsidation et le bourgeonnement des virions vers le lumen des citernes de Golgi. Un processus d'exocytose cellulaire transporte les virions vers la membrane plasmique où ils sont libérés dans l'espace extracellulaire (Pepin et al., 2010).

1.4 Les protéines non structurales

Comme nous venons de le voir, la totalité du cycle viral du VFVR se déroule dans le cytoplasme de la cellule. Or d'importantes défenses antivirales existent non seulement dans le cytoplasme, mais aussi dans le noyau et dans la mitochondrie. La pression évolutive exercée par les réponses antivirales de l'hôte sur le génome des bunyavirus a façonné la structure des

protéines non structurales qui protègent le virus de la réponse cellulaire et stimulent la réplication virale (Eifan et al., 2013, Kreher et al., 2014).

La protéine Non-Structurale (NSs) codée par le segment S

La protéine NSs du VFVR est codée par le segment S. Une fois synthétisée, elle est localisée majoritairement dans le noyau de la cellule. NSs est le seul composant viral identifié à y avoir accès. Dans le noyau des cellules des Mammifères, la protéine NSs s'organise en structures filamenteuses par oligomérisation des nombreuses molécules présentes (Yadani et al., 1999, Struthers et al., 1984).

Plusieurs études ont montré que NSs est le facteur majeur de virulence du VFVR et que son organisation en filaments est essentielle à l'exécution de ses fonctions (Billecocq et al., 2004, Bouloy et al., 2001, Reed et al., 2012, Vialat et al., 2000). L'une des fonctions principales de NSs est l'inhibition spécifique du système antiviral de l'interféron β (Le May et al., 2008, Billecocq et al., 2004, Benferhat et al., 2012). En effet, l'inactivation de NSs empêche la réplication normale du VFVR dans les cellules et les animaux ayant une voie fonctionnelle de signalisation interféron β (Gommet et al., 2011, Ikegami et al., 2006).

D'autres protéines de l'hôte ayant une activité antivirale sont également ciblées directement par le VFVR, en particulier la protéine kinase induite par l'interféron (PKR) (Ikegami et al., 2009, Habjan et al., 2009) et des facteurs d'inflammation, comme le récepteur de l'interleukine 10 (Benferhat et al., 2012). De plus, la protéine NSs inhibe la transcription du génome de l'hôte en séquestrant la sous-unité p44 du facteur général de transcription TFIID (Le May et al., 2004, Kalveram et al., 2011).

Une étude de « *ChIP-on-chip* » (Benferhat et al., 2012) a montré que NSs interagit directement avec de nombreuses régions régulatrices de gènes de l'hôte. Les auteurs ont observé un effet très variable de NSs sur la régulation de l'expression génique, agissant tantôt comme un inhibiteur, tantôt comme un activateur transcriptionnel. Ces gènes cibles de NSs sont impliqués dans une grande variété de fonctions cellulaires. Les changements d'expression entraînés par NSs affectent notamment les gènes de la cascade de la coagulation sanguine, ce qui pourrait contribuer au développement de la fièvre hémorragique.

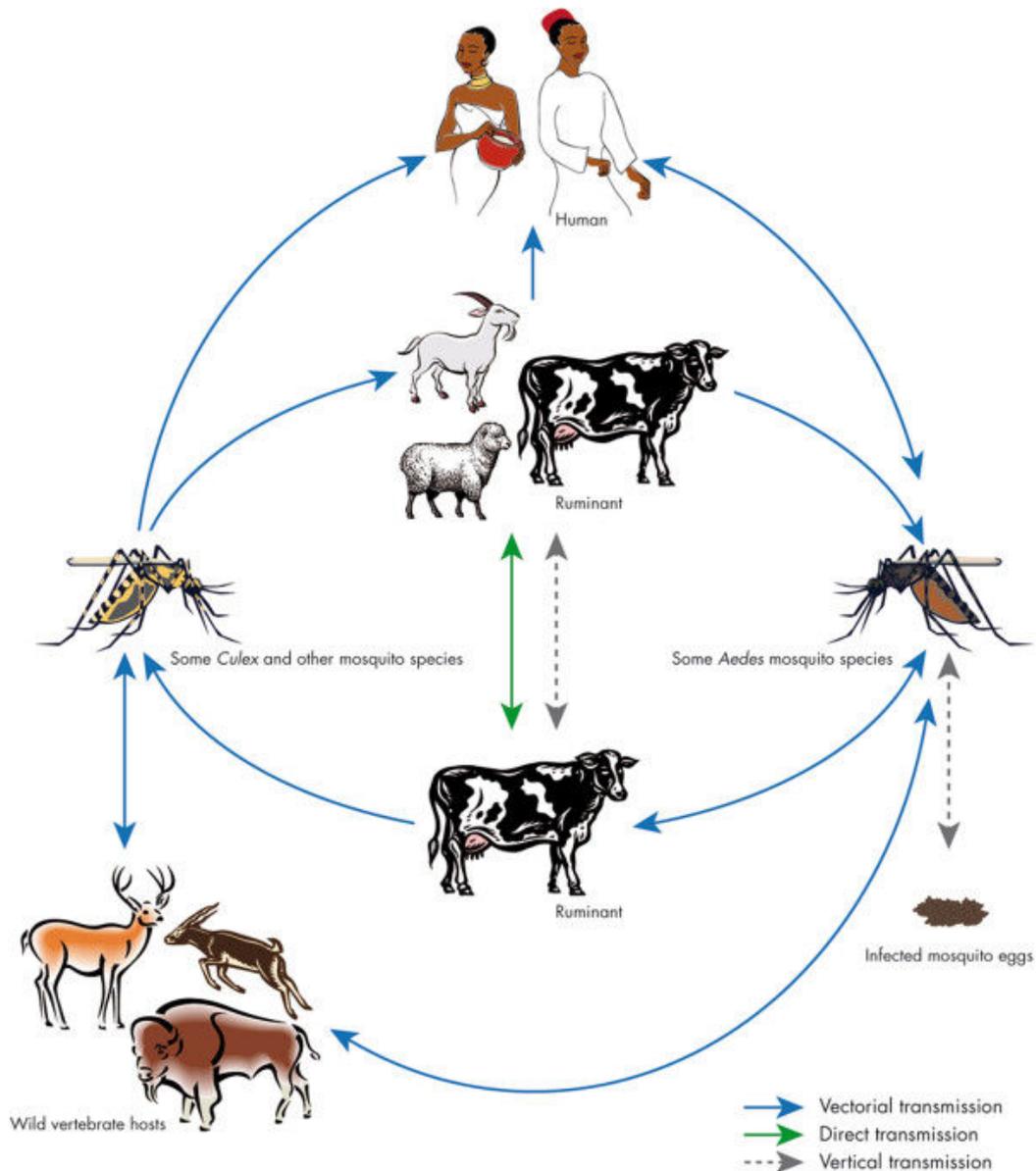


Figure 2: Cycle de la FVR.

Le virus est maintenu dans un cycle enzootique qui est favorisé par la transmission verticale (flèche grise) observée chez les moustiques du genre *Aedes*. La survenue d'épizooties est souvent liée à la saison des pluies et aux périodes d'inondations. Ces conditions climatiques sont idéales pour l'éclosion des œufs de moustiques *Aedes* infectés qui sont capables d'initier la circulation du virus (transmission vectorielle – flèche bleue). Ensuite, un grand nombre de vecteurs secondaires appartenant au genre *Culex* peut être infecté et induire l'émergence d'épidémies/épizooties. La transmission à l'homme est provoquée majoritairement par le contact direct (flèche verte) avec des titres viraux importants lors de la manipulation du bétail ou des fœtus avortés.

(Balenghien et al., 2013)

1.5 La toxicité pour la cellule

L'effet cytotoxique d'une infection par le VFVR est très variable selon le type cellulaire et l'espèce animale (Schmaljohn and Patterson, 1990). Ceci est d'autant plus vrai que l'infection chez les arthropodes est considérée comme inoffensive (Lyons and Heyduk, 1973, James and Millican, 1986). Alors que, chez les Mammifères, on observe un effet inhibiteur marqué sur la synthèse des protéines de la cellule-hôte, cette inhibition est négligeable chez les invertébrés où l'infection virale semble ne pas interférer avec l'activité normale de la cellule (Leger et al., 2013). Lors de l'infection des Mammifères, le VFVR cible en particulier les hépatocytes (Reed et al., 2012, Anderson and Smith, 1987, Peters et al., 1988, Smith et al., 2010, Gomet et al., 2011) qui sont responsables de la régulation et de la production des facteurs de la coagulation sanguine.

2 La transmission

Le cycle épidémiologique du VFVR (**Figure 2**) commence lors de la saison des pluies et la période des inondations dans les régions dont le climat est tropical (Davies et al., 1985). Cette saison est une période de l'année qui combine les conditions climatiques idéales pour l'amplification de la population des moustiques vecteurs (Ikegami, 2012, Pepin et al., 2010).

2.1 Le vecteur

Les deux genres d'arthropodes, *Aedes* et *Culex*, présentent les espèces de moustiques les plus importantes pour la transmission virale (Fontenille et al., 1995, Fontenille et al., 1998, Chevalier et al., 2010). Cependant, les hôtes du virus ne se limitent pas à ces genres et le VFVR a été détecté dans un grand nombre d'autres groupes d'insectes dont les genres *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Eretmapodite*, *Mansonia* et *Ochleortatus* (Davies and Highton, 1980, Fontenille et al., 1998, Chevalier et al., 2010).

Malgré la courte durée de vie des organismes vecteurs, le virus est maintenu dans une même population d'une génération à la suivante grâce à la transmission transovarienne. Ce mécanisme permet au virus d'entrer dans une phase de latence et ainsi de résister aux saisons défavorables pour la population vectorielle (Linthicum et al., 1985). L'éclosion des œufs issus

de femelles infectées produit des individus qui sont eux aussi infectés. Cela explique la nature intervallaire et saisonnière des épidémies de FVR.

Comme il a été mentionné précédemment, l'infection est asymptomatique chez le moustique, mais elle se propage à tout l'organisme avec une accumulation préférentielle du virus dans les glandes salivaires. Dans ces conditions, la quantité de virus injectée par le moustique femelle à l'hôte vertébré lors de son alimentation est maximisée (Schneider and Higgs, 2008, Le Coupanec et al., 2014).

2.2 L'hôte

Les hôtes vertébrés les plus affectés par la FVR sont les Ruminants domestiques – les bœufs, les moutons, les chèvres – et sauvages – le buffle d'Afrique, les antilopes (Ikegami, 2012, Himeidan et al., 2014, Daubney R., 1931). Cela semble naturel car ces animaux de grande taille sont souvent les proies des populations de moustiques femelles. Chez les Ruminants, la transmission vectorielle par le moustique est considérée comme la voie principale d'infection (Bird et al., 2009), mais la transmission de la mère à l'enfant (verticale) ainsi que l'exposition directe aux aérosols et fluides corporels infectés ne sont pas négligeables. Du fait de leur grande taille et des titres élevés de virus dans l'organisme infecté, les Ruminants sont considérés comme des hôtes permettant une amplification de l'épidémie (Pepin et al., 2010). L'existence dans la nature d'un réservoir de VFVR constitué d'espèces de Rongeurs sauvages ou de chauves-souris n'est pas confirmée à ce jour (Olive et al., 2012, Oelofsen and Van der Ryst, 1999).

L'Homme peut aussi être infecté par le VFVR et développer une maladie. Bien que la piqûre de moustique soit décrite comme une voie de transmission du virus à l'Homme (Davies and Martin, 2006), le contact entre l'Homme et le bétail reste la voie majeure d'infection (Pepin et al., 2010). En effet, les éleveurs, les fermiers et les ouvriers d'abattoir constituent le groupe à risque prédominant à cause de leur exposition constante aux carcasses et fluides corporels d'animaux (sang, lait et sécrétions) qui peuvent être infectés (Easterday et al., 1962, Sissoko et al., 2009). Aucune transmission directe entre personnes n'a été rapportée (Chevalier et al., 2010). L'Homme est un hôte terminal du cycle épidémiologique du VFVR (Chevalier et al., 2010).

*

Puisque la FVR est une maladie majoritairement animale dont l'Homme est un hôte accidentel, elle est classée parmi les maladies zoonotiques.

« [Io :] (...) *tandis que moi, déchirée par le taon, fouettée par une main divine, je cours de pays en pays. Tu as entendu mes aventures.* »¹¹

LE VFVR, D’OÙ VIENT-IL ?

1. L’épidémiologie : les origines et l’expansion

L’étude de l’histoire évolutive et génétique de 60 spécimens du VFVR (Bird et al., 2007) a placé le dernier ancêtre commun à tous les spécimens à la fin du XIX^e siècle (1880-1890). Cette période est marquée par le partage de l’Afrique entre les puissances européennes, ce qui a provoqué des changements écologiques majeurs dans l’est et le sud du continent africain, en particulier l’introduction de nouveaux systèmes d’agriculture (Hanotte et al., 2002) et l’importation de bétail d’origine européenne (MacOwan, 1994). Les données évolutives suggèrent qu’entre la fin du XIX^e et le début du XX^e siècles, un arbovirus inconnu, ancêtre de l’actuel VFVR, a exploité les nouvelles conditions et niches écologiques créées par le colonialisme et l’accumulation d’animaux particulièrement sensibles au virus. Les premiers témoignages sur une épidémie présentant les empreintes de la FVR, en 1915 au Kenya, sont en accord avec cette hypothèse (Swanepoel and Coetzer, 2004). Pourtant, le virus n’a été isolé et identifié qu’en 1931 (Daubney R., 1931), lors d’une épizootie survenue dans la Vallée du Rift au Kenya, qui a donné son nom à la fois à la maladie et au virus.

D’autres épidémies de FVR se sont produites de façon périodique au Kenya jusqu’en 1951, quand le premier patient atteint de la maladie a été identifié en Afrique du Sud (Joubert et al., 1951). C’était la première fois que la FVR était détectée en dehors du Kenya. Depuis, le virus a traversé la Vallée du Rift et a été introduit en Tanzanie, au Zimbabwe et en Zambie. De là, le VFVR a atteint l’Afrique de l’Ouest, notamment le Sénégal et la Mauritanie en 1987 (Davies, 2010, Himeidan et al., 2014), où il est à l’origine d’une épidémie qui provoqua plus de 200 décès.

En un peu plus de 30 ans, l’aire géographique du VFVR s’est étendue à toute l’Afrique subsaharienne et le virus est devenu endémique dans une dizaine de pays (**Figure 3**). Alors qu’initialement les épidémies n’affectaient qu’une zone limitée dans chaque pays, la répétition périodique des épisodes de FVR a favorisé l’expansion géographique du virus dans

¹¹ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 675-724

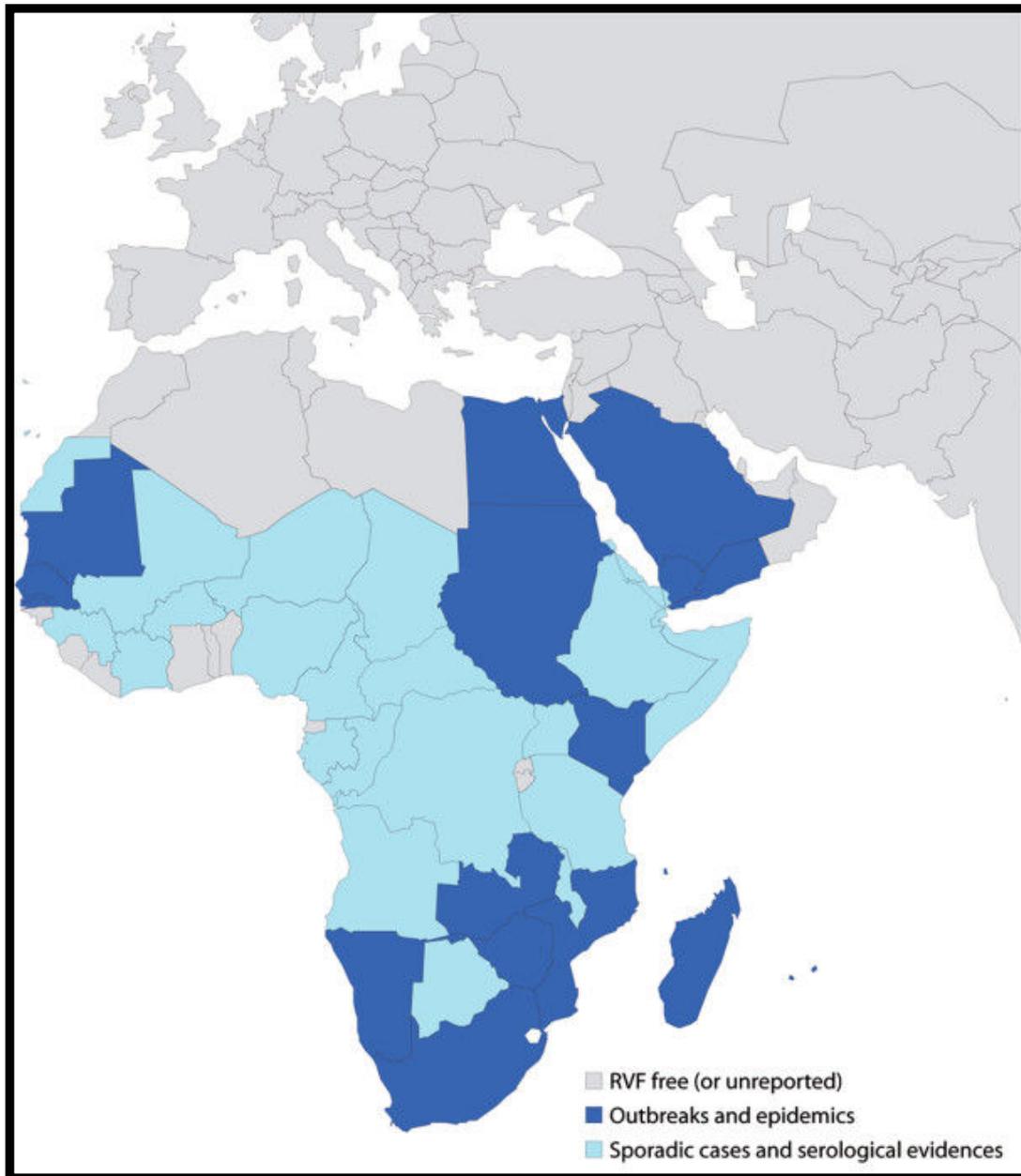


Figure 3: Distribution géographique de la FVR.

Historiquement, la FVR est endémique dans plusieurs pays de l’Afrique subsaharienne (bleu foncé). La propagation de la maladie à Madagascar a été observée pour la première fois en 1991. En 2000, la maladie a provoquée une épidémie dans la Péninsule Arabique. Des cas sporadiques (bleu clair) ont été rapportés à Mayotte depuis 2004.

D’après Chevalier et al, 2010

un même pays. C'est ainsi qu'en Tanzanie les premières épidémies, entre 1930 et 1957, n'ont touché que moins d'1% du territoire, celle de 1977-1978 a affecté 3,33% du pays, et la plus récente, en 2006-2007, a concerné 39,70% du pays (Sindato et al., 2014). L'expansion territoriale en Afrique subsaharienne se poursuit surtout à cause de l'augmentation des populations de vecteurs et des mouvements non-surveillés du bétail (Sindato et al., 2014, Murithi et al., 2011, Himeidan et al., 2014).

Le virus a aussi suivi les routes du Nord et est arrivé dans la Vallée du Nil, tout d'abord au Soudan du Sud et ensuite dans la République du Soudan où une première épidémie a été rapportée en 1973 (Davies, 2010). Le VFVR a été identifié pour la première fois en Égypte, le premier pays méditerranéen affecté, pendant l'épidémie de 1977-1978. Cette dernière a eu des conséquences économiques et de santé publique majeures pour le pays, avec environ 200 000 personnes malades et 600 décès (Davies, 2010, Abdel-Wahab et al., 1978, Chevalier et al., 2010). L'épidémie de 1977-1978 demeure l'une des plus grandes épidémies de FVR.

Plus récemment, la maladie s'est propagée à l'extérieur de l'Afrique, d'abord en 1991 à Madagascar (Morvan et al., 1991), où au moins 32 espèces de vecteurs ont été identifiées (Tantely et al., 2015), et postérieurement, en 2000, dans la Péninsule Arabique où elle a provoqué une épidémie aux proportions considérables. En Arabie Saoudite, quelque 40 000 têtes de bétail sont mortes (Al-Afaleq and Hussein, 2011) et, parmi 883 cas d'infection humaine, 124 décès ont été enregistrés. Au Yémen, le nombre de personnes infectées a été supérieur, soit 1 328 dont 166 mortels (Ahmad, 2000, CDC, 2000a, CDC, 2000b).

Ces dernières années, la FVR a continué de s'étendre aux îles de l'Océan Indien – à Mayotte en 2007-2008 (Sissoko et al., 2009) et 2011 (Balenghien et al., 2013) et dans d'autres îles de l'archipel des Comores (Roger et al., 2011) – et de frapper les pays Africains, la Somalie (2006-2007), le Kenya (2006-2007), le Soudan (2007-2008), et la Namibie (2010) (Himeidan et al., 2014, Chevalier et al., 2010, Hassan et al., 2011).



L'évolution et l'expansion des épidémies de FVR ont révélé une transition de l'épidémiologie de la maladie très inquiétante pour les pays affectés : la maladie majoritairement épizootique, avec un nombre très faible (Chevalier et al., 2010) de décès humains (estimés à moins de 1%) est devenu une zoonose émergente qui infecte un nombre considérable de personnes et comporte un risque accru de mortalité (14% en Arabie Saoudite en 2000 (Balkhy and Memish, 2003) et 30,8% au Soudan (El Imam et al., 2009) en 2007).

2. L'épidémiologie : les conséquences socio-économiques

Le tropisme préférentiel du VFVR pour le bétail est à l'origine des conséquences économiques désastreuses que subissent les pays endémiques pour la maladie.

2.1 Le niveau microéconomique

Le premier secteur impacté par les épidémies récurrentes de FVR est, sans doute, le pastoralisme (Daubney R., 1931, Bird et al., 2009). En effet, les cultures rurales forment le cœur de la société dans un grand nombre de pays africains, jouant un rôle très important dans les économies nationales. Dans les sociétés pastorales, le bétail est la base de la subsistance : il est le réservoir de la richesse familiale et la source des biens primaires (lait, viande, traction animale) et commerciaux (moyen de paiement et d'échange). En outre, le bétail joue un rôle important dans la vie culturelle et religieuse ainsi que dans l'organisation des sociétés rurales (Davies, 2006, Peyre et al., 2015). Ces facteurs expliquent l'impact considérable des épidémies de FVR au niveau domestique et microéconomique.

2.2 Le niveau méso-économique

Puisque le pastoralisme est central dans l'économie africaine, la déstabilisation de ce secteur a des effets sur d'autres sphères de la société à court ou à long terme. Les épidémies de FVR ont des répercussions dans toute la chaîne de traitement, transformation et vente du bétail. L'impact économique cumulatif de la FVR dans l'industrie du bétail est souvent plus important que celui observé chez le petit producteur (Rich and Perry, 2011, Murithi et al., 2011). La mortalité élevée des animaux au Kenya lors de l'épidémie de 2007 a représenté une

perte de 32 millions de dollars par comparaison aux 9,3 millions de dollars de dommages estimés pour le producteur (Peyre et al., 2015). D'autres industries parallèles, comme le transport et le tourisme, sont aussi lourdement affectées.

2.3 Le niveau macroéconomique

Aux problèmes de micro- et méso-économie, s'ajoutent encore les interdictions d'exportation des animaux et de leurs dérivés imposées par les agences sanitaires internationales (Cagnolati et al., 2006). Dans les économies dépendantes de l'exportation du bétail, les interdictions ont des conséquences dévastatrices et permanentes sur l'économie nationale : la dévalorisation de la monnaie nationale, l'augmentation du prix des biens importés, des pertes importantes du Trésor public et une aggravation du chômage en sont quelques exemples. En Somalie, par exemple, les interdictions successives de commercialisation du bétail entre 1998 et 2000 ont eu un coût total de 330 millions de dollars (Peyre et al., 2015).

*

De nombreux pays affectés par des épidémies périodiques de la FVR sont des pays en développement qui manquent d'infrastructures et de ressources de santé appropriées pour la gestion des zoonoses. Dans l'économie de ces pays, le coût associé à la gestion de la Santé Publique n'est pas négligeable et l'investissement financier insuffisant (Zinsstag et al., 2007). Ces conditions alliées aux pertes économiques considérables empêchent le développement des stratégies de surveillance, prévention et traitement nécessaires au contrôle et à l'éradication du virus.

« [Io :] *Quel est ce pays ? Quelle est cette race ?*
Apprends-moi dans quel pays du monde mes erreurs m'ont amenée ? »¹²

LE VFVR, OÙ VA-T-IL ?

Historiquement, le VFVR est un virus endémique des pays tropicaux de l'Afrique subsaharienne (Chevalier et al., 2010, Himeidan et al., 2014). Ce n'est qu'en 1977 qu'il a traversé le Sahara pour la première fois par la Vallée du Nil et est devenu endémique d'un pays méditerranéen, l'Égypte (Davies, 2010, Abdel-Wahab et al., 1978). Comme nous l'avons vu, le virus s'est plus récemment étendu en dehors du continent africain dans la péninsule arabique (Ahmad, 2000) et son aire géographique continue d'augmenter (Chevalier et al., 2010, Himeidan et al., 2014). Les facteurs majeurs contribuant à cette expansion sont : i) les changements climatiques provoqués par l'activité humaine et ii) une globalisation et un commerce international croissants. D'une part, le réchauffement de la planète a comme conséquence une accélération de l'évolution des niches écologiques des régions de latitude plus élevée qui permet la migration des populations vectrices vers les régions tempérées (Chevalier et al., 2004a, Chevalier et al., 2004b, Martin et al., 2008, Chevalier et al., 2010). D'autre part, la globalisation est associée aux mouvements de personnes, animaux et produits d'origine animale dans le monde entier (Pfeffer and Dobler, 2010, Rolin et al., 2013). Cela peut même contribuer à l'introduction de vecteurs infectés dans de nouvelles régions par les voies aériennes et maritimes (Russell, 1987, Hartley et al., 2011). L'impact de ces facteurs est illustré par la récente détection de moustiques infectés en Mauritanie (Soti et al., 2012) et de chameaux à la sérologie positive pour le VFVR au Maroc (El-Harrak et al., 2011).

1. Les risques pour l'Occident

Grâce aux interdictions d'importation en Europe et aux Etats-Unis d'Amérique d'animaux originaires des pays touchés par le virus, le risque d'importation légale d'animaux infectés est très faible (Chevalier et al., 2010, Kasari et al., 2008). Néanmoins, l'échange d'animaux infectés à travers le marché noir représente un risque réel et souvent sous-estimé dont nous ne connaissons pas la vraie dimension (Chevalier et al., 2010). La dispersion transcontinentale du VFVR par des vecteurs infectés est une affaire plus sensible et qui

¹² Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 529-585

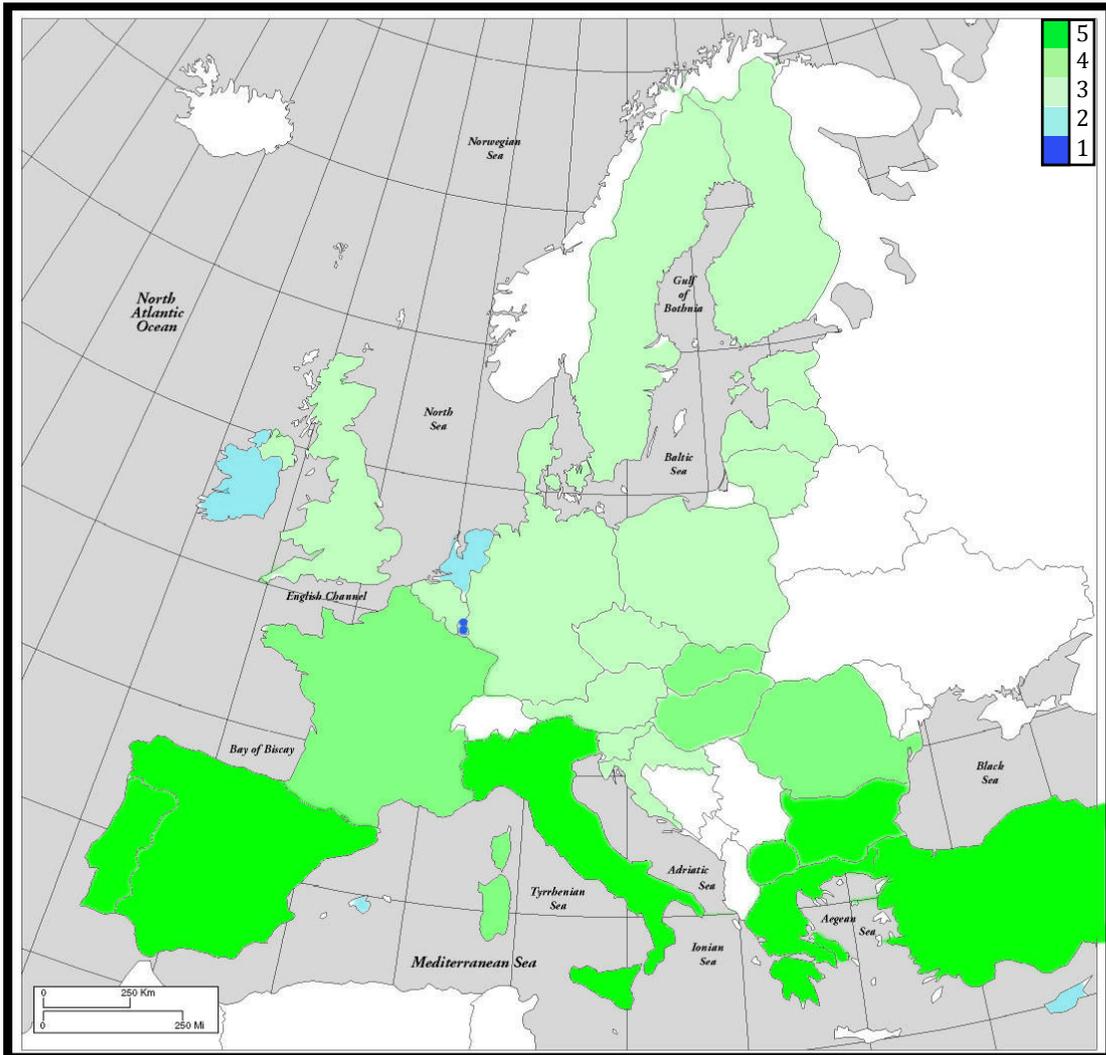


Figure 4: Distribution de moustiques vecteurs du VFVR connus dans les pays de l'Union Européenne et dans les pays candidats.

L'échelle de couleurs utilisée indique le nombre d'espèces de moustiques présents dans chaque pays (1 à 5 espèces de vecteurs).

D'après Chevalier et al, 2010

suscite une inquiétude croissante. Des moustiques infectés par le VFVR ont été retrouvés en Égypte, en Arabie Saoudite et en Mauritanie (Bird et al., 2009, Chevalier et al., 2004a). Alors que la traversée de la méditerranée excède la capacité de vol des vecteurs, des routes viables de dissémination existent entre le nord de l’Afrique et l’Espagne (Lopez-Velez and Molina Moreno, 2005), ou passant par le Moyen-Orient et la Turquie (Albayrak and Ozan, 2012). Bien que cela semble peu probable durant les périodes inter-épidémiques, le risque serait élevé lors des épisodes épidémiques. Une fois le vecteur infecté à l’intérieur de l’espace européen, la dissémination du virus serait très rapide compte tenu de la présence de plusieurs espèces d’arthropodes compétentes (**Figure 4**) pour la transmission du virus au Sud de l’Europe (Moutailler et al., 2008). Quant aux Etats-Unis d’Amérique, une introduction du VFVR par la migration naturelle des vecteurs est très improbable (Kasari et al., 2008), même en tenant compte de la capacité de dispersion des ouragans. Toutefois, il existe un risque d’introduction de vecteurs en Amérique du Nord par les vols transatlantiques. Le risque est souligné dans des rapports de vol qui mettent en évidence la présence d’arthropodes vivants dans les avions (Russell, 1987) et l’absence de protocoles établis pour leur contrôle après les voyages aériens (Kasari et al., 2008). Ce cas de figure est encore plus probable pour les vols entre l’Afrique et l’Union Européenne à cause de la durée plus courte de ces voyages (Rolin et al., 2013).

Outre l’introduction naturelle et involontaire du virus dans les pays occidentaux, l’introduction intentionnelle du VFVR est vue comme une vraie menace par les états. Le VFVR est classé comme un pathogène de niveau de biosécurité 3 en Europe et de niveau 4 aux Etats-Unis d’Amérique. Il fait partie d’une liste où figurent d’autres pathogènes à risque de bioterrorisme, comme la bactérie *Bacillus anthracis* à l’origine de l’anthrax (NIAID, 2015). De plus, la Commission pour la prévention de la prolifération des armes de destruction massive et bioterrorisme (Graham et al., 2008) créée par le Congrès américain au lendemain des événements du 11 Septembre a identifié le VFVR en tant que menace réelle de bioterrorisme pour les pays développés. De même, l’Institut National Américain pour l’Allergie et les Maladies Infectieuses l’a classé comme pathogène prioritaire de Catégorie A (NIAID, 2015) – c’est-à-dire un risque pour la sûreté nationale à cause de sa manipulation facile et de sa dissémination rapide. En France, le VFVR est classé parmi les Micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOTs) et sa détention ainsi que sa manipulation, uniquement par un personnel habilité, sont soumises à des règles et protocoles très stricts (ANSM, 2015). Les craintes liées à l’utilisation du VFVR pour le bioterrorisme ne

sont pas récentes et ce risque avait déjà été évalué dans le programme d'armes biologiques des Etats-Unis d'Amérique, terminé en 1969, qui avait réussi à développer une arme biologique à partir de ce virus. Aujourd'hui, toutes les agences de sûreté des Etats-Unis d'Amérique et de l'Union européenne sont d'accord quant aux conséquences socioéconomiques majeures ainsi qu'à la panique généralisée que l'introduction du VFVR provoquerait dans les pays occidentaux (Rolin et al., 2013, Mandell and Flick, 2010, Sidwell and Smee, 2003).

« [Io :] *Quels malheureux endurèrent jamais, hélas ! des maux pareils aux miens ?
Allons, indique-moi clairement quelles souffrances m'attendent encore.* »¹³

QUELLES MALADIES PROVOQUE LE VFVR ?

1. La pathogenèse chez l'Homme

La majorité des patients traités pour une infection par le VFVR ont développé une pathologie bénigne et spontanément résolutive caractérisée par des symptômes grippaux. Toutefois, un faible pourcentage des individus atteints a développé une des trois formes sévères : une maladie neurologique (encéphalite, méningite), une rétinite ou une fièvre hémorragique (Findlay and Daubney, 1931, Daubney et al., 1931, Ikegami and Makino, 2011). Ces trois formes ont abouti au décès du patient ou ont laissé des séquelles plus ou moins graves, selon la sévérité et le suivi médical (**Figure 5**).

1.1 La maladie spontanément résolutive

La maladie bénigne qui caractérise la grande majorité des cas d'infection par le VFVR a un temps d'incubation de 4 à 6 jours. Après la période d'incubation, des symptômes grippaux (Findlay and Daubney, 1931, Kitchen, 1934, Francis and Magill, 1935) - frissons, malaises, affaiblissements et étourdissements, maux de têtes et nausées - surgissent soudainement. Ces manifestations pathologiques sont suivies de fièvre (souvent entre 38,8°C et 39,5°C), d'une diminution de la pression sanguine, de douleurs corporelles généralisées, rougeur des yeux et photophobie. Une amélioration des symptômes est souvent observée à partir du 3^{ème} jour et une température normale est rétablie au 4^{ème} jour après l'apparition des premiers signes de la maladie. Des cas de fièvre de longue durée (jusqu'au 10^{ème} jour) sont fréquents (Findlay and Daubney, 1931). La période de convalescence peut atteindre 2 semaines (Kitchen, 1934). La charge virale est détectable dans le sang durant la période fébrile et des anticorps neutralisants apparaissent aux environs du 4^{ème} jour après les premiers symptômes (Findlay and Daubney, 1931, Kitchen, 1934, Sabin and Blumberg, 1947).

¹³ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 586-628

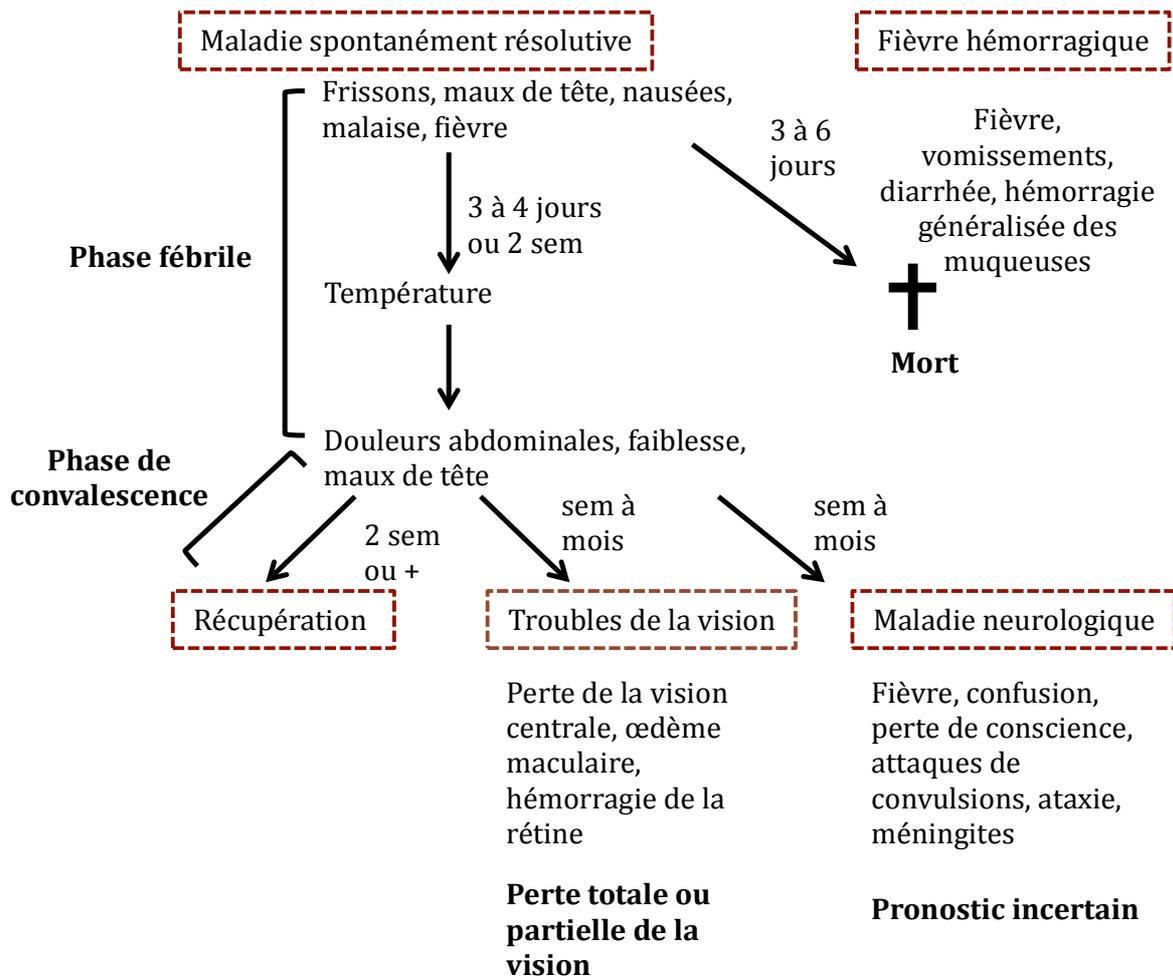


Figure 5: Les formes pathologiques de la FVR chez l'homme.

1.2 La maladie neurologique

De nombreux cas d'atteinte neurologique chez l'Homme ont été suivis et rapportés par des médecins lors des épidémies (Maar et al., 1979, Alrajhi et al., 2004). Dans tous les cas, les individus avaient initialement souffert des symptômes précoces susmentionnés. Les premiers signes de troubles neurologiques ne sont apparus que très tardivement (de quelques semaines à quelques mois) après la maladie précoce. Les symptômes neurologiques relevaient de la confusion, d'une perte de vision transitoire et d'une perte de conscience, de convulsions chez les uns, d'ataxie chez les autres. Il existe des rapports qui mentionnent des hallucinations et des méningites dans quelques cas (Laughlin et al., 1978). Tous les patients analysés ont présenté des infiltrations de leucocytes dans le tissu nerveux, majoritairement des lymphocytes et des macrophages (van Velden et al., 1977). Cet état est accompagné d'une fièvre de durée variable.

1.3 Les affections de la rétine

Un certain nombre d'individus infectés par le VFVR ont développé une maculopathie ou une rétinopathie. La survenue de manifestations de la pathologie oculaire est très variable – dès les premiers signes de l'infection jusqu'à plusieurs semaines ou mois. Les patients ont décrit une perte de la vision centrale ou une vision trouble qui pouvait affecter un seul œil ou les deux (Siam et al., 1980, Salib and Sobhy, 1978, Deutman and Klomp, 1981). Les yeux affectés présentaient toujours un œdème maculaire avec des exsudats et parfois une hémorragie de la rétine (Salib and Sobhy, 1978, Schrire, 1951). Dans un grand nombre de cas, les individus ont développé des séquelles permanentes et n'ont jamais récupéré une acuité visuelle complète (Freed, 1951, Salib and Sobhy, 1978).

1.4 La fièvre hémorragique

La majorité des décès hospitaliers sont survenus après l'observation de symptômes de fièvres hémorragiques (Yassin, 1978, Abdel-Wahab et al., 1978, Swanepoel et al., 1979, Ikegami and Makino, 2011). Cette forme sévère de la maladie se développe rapidement après l'infection. Elle est caractérisée par de la fièvre, des vomissements et des douleurs dans le corps. Un nombre important de patients a développé des rougeurs de la peau ainsi que des saignements de la gencive et de la muqueuse gastro-intestinale. La diarrhée, l'ictère et

l'hépto-splénomégalie sont également des manifestations fréquentes de la fièvre hémorragique (Swanepoel et al., 1979, Yassin, 1978). Au niveau biochimique, les patients ont présenté une augmentation du niveau circulant des transaminases hépatiques – l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) – et une diminution du taux de plaquettes et de l'hémoglobine sanguine. Le temps décrit entre l'apparition des symptômes et la mort du patient est très variable. Dans certains cas, la mort est survenue entre les 3^{ème} et 6^{ème} jours après les premiers signes de fièvre hémorragique. D'autres patients ont survécu environ 2 semaines après le début des symptômes. L'autopsie des individus décédés a révélé une atteinte sévère du foie caractérisée par la nécrose diffuse des hépatocytes centrolobulaires (Swanepoel et al., 1979, Abdel-Wahab et al., 1978). Ces observations indiquent que la fièvre hémorragique provoquée par le VFVR est associée à des hépatites aiguës.

2 La pathogenèse chez le bétail

Les manifestations de la maladie chez le bétail sont très dépendantes de l'espèce et de l'origine des animaux (Chevalier et al., 2010). Une grande variabilité de sensibilité a été observée parmi des espèces biologiquement proches : les moutons sont plus sensibles que les chèvres. De plus, des études effectuées lors d'épizooties de FVR ont décrit une résistance accrue chez les animaux originaires des régions d'endémie, contrairement aux animaux introduits d'autres régions non affectées qui ont présenté une grande sensibilité. Le degré de sévérité de la maladie est aussi associé à l'âge des animaux infectés (Daubney et al., 1931). Les jeunes animaux sont décrits comme très sensibles et des taux de mortalité de 95-100% ont été observés chez les nouveaux-nés (Chevalier et al., 2010, Easterday, 1965). Ces animaux présentent les signes très caractéristiques d'une fièvre hémorragique : des températures très élevées (plus de 40°C), une perte d'appétit et d'activité ainsi que des diarrhées hémorragiques (Easterday et al., 1962). Comme les jeunes animaux meurent en 40h après l'apparition des symptômes (Chevalier et al., 2010), la présence de troubles neurologiques n'a jamais été constatée (Coetzer, 1977). Le taux de mortalité chez les animaux adultes est faible (20-30%) et les animaux qui survivent ne développent pas de maladies sévères (Chevalier et al., 2010). Néanmoins, l'infection de femelles gestantes entraîne très souvent l'avortement des fœtus, ce qui est devenu le signe le plus caractéristique du début d'une épizootie de FVR (Daubney et al., 1931, Chevalier et al., 2010, Ikegami and Makino, 2011). Bien que variable, le taux d'avortement peut atteindre 100%. Les complications associées à l'avortement provoquent parfois le décès de la femelle gestante.

*

La fièvre de la Vallée du Rift est une maladie complexe qui affecte un éventail très large d'hôtes et qui se manifeste de manières très variées selon les espèces et les populations atteintes. Les différences de sensibilité et de pathologie lors d'une même épidémie indiquent que les facteurs génétiques de l'hôte sont décisifs pour l'évolution et le dénouement de la maladie. La variabilité phénotypique constitue un défi majeur pour le développement des stratégies et des traitements qui permettent une réduction de la morbidité et de la mortalité liées à la FVR.

« [Prométhée :] *Le premier aussi j'accouplai les animaux et les asservis au joug et au bât pour prendre la place des mortels dans les travaux les plus pénibles.* »¹⁴

LES MODÈLES ANIMAUX : QUE CONNAÎT-ON ?

Le VFVR est un virus au tropisme très large, virulent pour de nombreuses espèces de mammifères. Cela a permis le développement de plusieurs modèles animaux qui permettent de mimer l'infection naturelle dans les conditions contrôlées de laboratoire.

1 Le mouton : un modèle de vaccination animale

Comme nous l'avons vu précédemment, le bétail est un hôte naturel du virus. L'étude de l'infection chez le mouton a été très informative non seulement pour la compréhension de l'évolution de la maladie, mais aussi pour l'évaluation de la protection immunitaire conférée aux grands animaux par les souches de virus atténuées et leurs effets secondaires (Kortekaas, 2014, Kortekaas et al., 2011). Trois souches atténuées du VFVR ont été testées chez le mouton : les souches *Smithburn*, MP-12 et Clone-13 (Muller et al., 1995). Alors que toutes les trois ont stimulé une réponse immunitaire protectrice contre une infection par la souche sauvage du VFVR, les deux premières ont provoqué des encéphalites et des avortements chez les femelles gestantes (Coetzer and Barnard, 1977, Hunter et al., 2002, Morrill et al., 1991), suscitant des inquiétudes quant à la sécurité de leur utilisation. En revanche, Clone 13 ne semble pas avoir d'effets pathogéniques et répond aux critères de sécurité et d'efficacité d'un vaccin animal (Dungu et al., 2010).

2 Le macaque rhésus : un miroir de l'Homme

L'infection des modèles primates non-humains est caractérisée par des symptômes et des maladies très variables qui généralement n'aboutissent pas à la mort (Peters et al., 1988, Morrill et al., 1990, Findlay and Daubney, 1931, Lorenzo et al., 2015). En effet, plusieurs recherches concernant des espèces différentes de singes ont montré que, selon la voie d'infection et la souche virale utilisée, la sensibilité de l'hôte peut être très différente (Peters et al., 1988, Morrill et al., 1990, Easterday, 1965). L'identification d'un modèle primate ayant

¹⁴ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 436-484

une réponse similaire à celle de l'Homme est une étape essentielle pour la recherche de vaccins et thérapies humaines qui restent à ce jour inexistantes.

Lors d'une étude menée en 1988, (Peters et al., 1988) des macaques rhésus ont été inoculés par la voie intraveineuse avec 10^5 PFU de la souche virale ZH501 isolée lors de l'épidémie de 1977 en Egypte. Parmi les cohortes de 15 à 20 macaques analysées, 20% ont développé une maladie sévère similaire à la fièvre hémorragique décrite chez l'Homme et sont décédés ; 40% ont présenté des symptômes d'une maladie hépatique et hémorragique modérée, mais se sont rétablis ; les 40% restants n'ont pas présenté de symptômes de FVR. D'autres études ont ensuite montré que la réponse à l'interféron est déterminante pour la survie des macaques rhésus (Morrill et al., 1989, Morrill et al., 1990). Le modèle primate établi par ces études est considéré comme celui qui ressemble le plus à l'infection de l'Homme par le VFVR.

3 Les rongeurs : le modèle par excellence

De nos jours, il n'est pas clair que les rongeurs soient des hôtes naturels du virus (Olive et al., 2012). Cependant, les modèles rongeurs ont fait preuve d'une grande valeur pour l'étude et la caractérisation de la virulence du virus et de la maladie qui en résulte dans le laboratoire.

3.1 Le rat

La sensibilité des rongeurs au VFVR a été étudiée pour la première fois dans les laboratoires de l'armée américaine dans les années 1950. Une première étude (Findlay and Howard, 1952) avait montré que la sensibilité à une même souche du VFVR est très différente parmi différentes lignées consanguines de rats et dépend donc du fonds génétique de l'hôte.

Les analyses de l'effet des facteurs génétiques de l'hôte chez le rat ont été approfondies par Clarence J. Peters qui a infecté par la voie sous-cutanée 8 lignées consanguines de rats avec deux doses – l'une modérée ($10^{3.7}$ PFUs), l'autre élevée ($10^{5.7}$ PFUs) - de la souche ZH501 du VFVR (Peters and Slone, 1982). Trois profils de réponse ont été observés : les rats des lignées Wistar-Furth (WF) et Brown Norway sont tous décédés avant le 4^{ème} jour après l'infection avec une nécrose hépatique. Ces chercheurs ont conclu que les deux lignées consanguines présentent une sensibilité accrue à la FVR. En revanche, la

majorité des rats Fisher 344, Buffalo, DA et Lewis a survécu aux 28 jours d'observation avec des taux de mortalité qui n'ont jamais excédé 15%. Ces 4 lignées ont été classées comme résistantes au virus. Le troisième profil, observé chez les rats des lignées consanguines ACI et Maax, a été caractérisé par des lésions nécrosantes et inflammatoires touchant le cerveau et la moelle épinière et entraînant des encéphalites, encéphalomyélites et des paralysies ascendantes. Les taux de mortalité ont été d'environ 50% dans les lignées ACI et Maax et les animaux sont morts entre les 11^{ème} et 16^{ème} jours après l'infection.

Des tests d'immunosuppression ont ensuite été menés sur des rats de la lignée résistante Lewis (Anderson et al., 1987). Après un traitement immunosuppresseur, les rats Lewis sont morts précocement (entre les 5^{ème} et 7^{ème} jours après l'infection). Ces résultats suggèrent que la lignée Lewis contient des facteurs génétiques impliqués dans la réponse immunitaire et importants pour la résistance au VFVR.

Une troisième étude a comparé la sensibilité des lignées WF (WF/mol) et Lewis (Lewis/mol) provenant d'élevages européens (Ritter et al., 2000). De manière surprenante, les résultats obtenus sur des lignées européennes ont été inverses de ceux obtenus sur les lignées d'élevages américains : la lignée WF était résistante au virus, alors que les rats Lewis étaient sensibles. Les tests de ségrégation du phénotype ont suggéré la présence d'un locus dominant responsable de la résistance chez WF ségrégeant de façon mendélienne. L'identité génétique de ce locus unique contrôlant la sensibilité/résistance à la FVR n'a pas été déterminée à ce jour. En comparant leurs résultats avec les études précédentes, les expérimentateurs ont proposé l'existence d'une variabilité génétique importante entre les lignées consanguines de rats produits par les différents éleveurs.

3.2 La Souris

Le modèle murin est généralement reconnu comme l'organisme mammifère de référence en laboratoire. C'est pourquoi plusieurs groupes de recherche ont voulu caractériser la maladie provoquée par le VFVR dans différentes lignées de souris (Bouloy et al., 2001, Vialat et al., 2000, Smith et al., 2010, Gomet et al., 2011, do Valle et al., 2010). L'ensemble de ces études ont abouti à deux conclusions principales : la Souris est un des modèles les plus sensibles à la FVR ; et ii) la pathologie résultante varie en fonction de la voie d'infection.

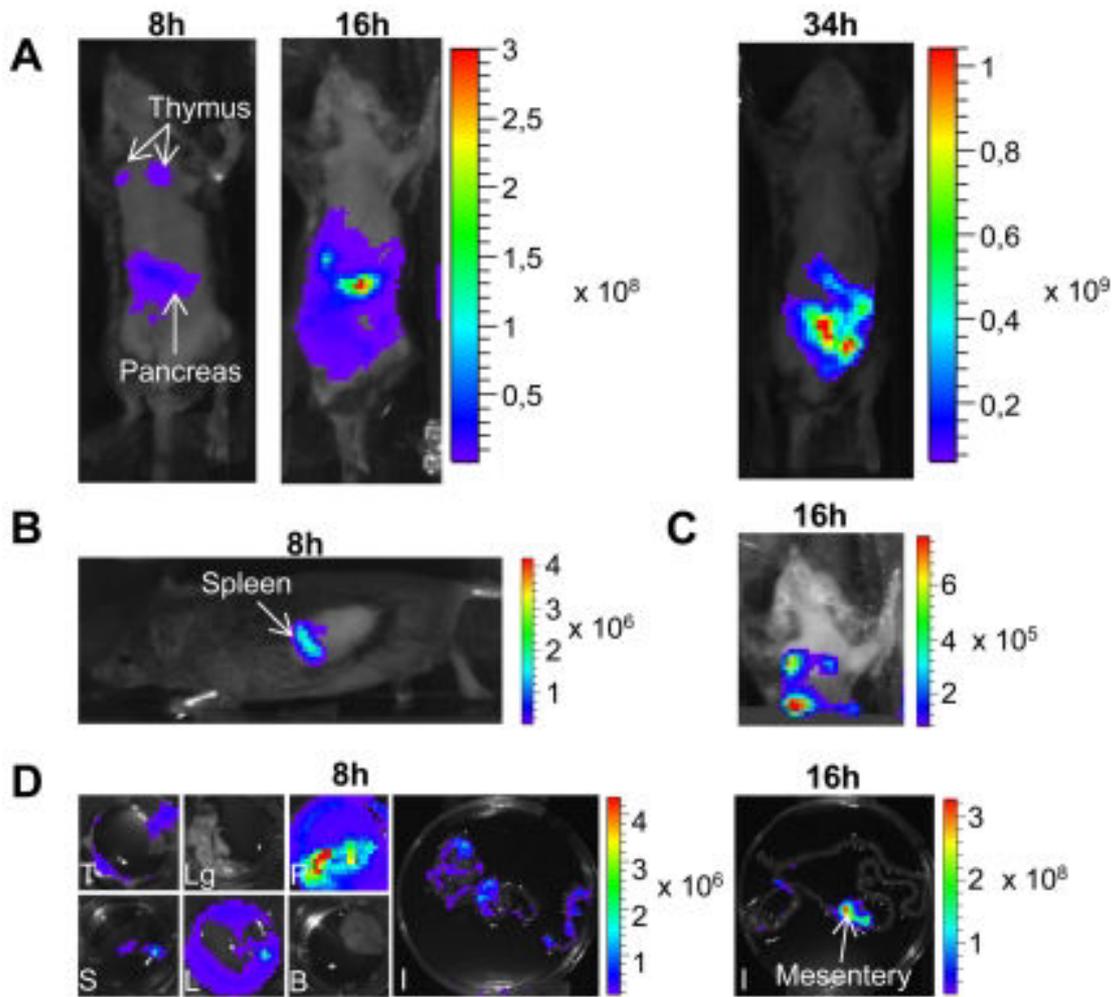


Figure 6: Sites de réplication de la souche virale rZHΔNSs-RLuc après une infection par voie intrapéritonéale.

(A) Visualisation d'une souris *Ifnr1*^{-/-} après l'infection intrapéritonéale avec 10^4 PFUs de rZHΔNSs-RLuc . Les images ont été réalisées aux temps indiqués après l'infection.

(B) Visualisation du profil gauche d'une souris à 8h après l'infection montrant le signal de bioluminescence dans la rate (*Spleen* sur la figure).

(C) Visualisation du thorax de la souris (A) à 16h après l'infection. En occultant la cavité abdominale, le signal de bioluminescence dans le thymus a été détecté.

(D) Images *ex vivo* après dissection à 8h et à 16h après l'infection (T, thymus; Lg, poumons; P, pancréas; S, rate; L, foie; B, cerveau; I, intestin).

(Gommet et al., 2011)

Un des travaux de référence sur la pathogenèse du VFVR chez la Souris a été réalisé par les laboratoires de l'armée américaine sur des souris de la lignée consanguine BALB/c (Smith et al., 2010). Des souris BALB/c femelles ont été inoculées avec 10^3 PFUs de la souche virulente ZH501 par la voie sous-cutanée. Environ la moitié des souris sont décédées au 3^{ème} jour après l'infection, à peine 24h après l'apparition des premiers symptômes : poil hérissé, posture prostrée et léthargie. Parmi les souris restantes, seulement 10% ont survécu jusqu'au 8^{ème} jour après l'infection et toutes sont mortes en présentant des signes d'encéphalite et de paralysie des membres postérieurs. Les changements morphologiques des tissus hépatiques et nerveux ont été également évalués au cours de l'infection. L'analyse de la phase précoce de la maladie (2^{ème} et 3^{ème} jours après l'infection) a révélé un tropisme préférentiel pour le foie, caractérisé par l'accumulation d'antigènes viraux dans le parenchyme hépatique et des lésions très sévères des hépatocytes. Les lésions observées pourraient, selon les auteurs, être à l'origine de la mortalité observée à ce stade. La souffrance hépatique aiguë a été confirmée par l'augmentation vertigineuse du niveau de l'alanine aminotransférase circulante. Les chercheurs ont montré que le groupe de souris ayant survécu à l'atteinte hépatique a initié la clairance virale du foie et du sang, mais n'a pas résisté à une infection généralisée du système nerveux caractérisée par la mort cellulaire des neurones, la présence de foyers d'inflammation et des microhémorragies.

Une autre étude menée dans notre laboratoire par Céline Gomet (2011) a caractérisé la dissémination et le tropisme tissulaire (**Figure 6**) de deux souches recombinantes du VFVR portant, insérées à la place du gène codant la protéine NSs, le gène codant la GFP, la protéine fluorescente verte de la méduse *Aequorea victoria* (rZHΔNSs-GFP) ou le gène hRLuc codant la luciférase bioluminescente humanisée de la pensée de mer *Renilla reniformis* (rZHΔNSs-hRLuc). Les deux souches rZHΔNSs-GFP et rZHΔNSs-hRLuc ne portent pas le gène majeur de virulence NSs. Elles ne sont donc pas virulentes sur des souris immunocompétentes. En revanche, elles provoquent la mort des souris *Ifnr1^{-/-}* qui ne portent pas d'allèle fonctionnel au locus codant le récepteur 1 de l'interféron α et β . En fait, les souris *Ifnr1^{-/-}* sont extrêmement sensibles aux virus portant une délétion du gène NSs et elles meurent 45h après l'infection. L'expression des protéines fluorescente et bioluminescente a permis une détection, une quantification et un suivi de la réplication du virus sur des animaux vivants (Gomet et al., 2011). Cette étude a non seulement confirmé que le foie, la rate et le cerveau sont des organes de forte réplication virale, mais elle a également mis en évidence le rôle des macrophages et des cellules dendritiques dans la réplication virale durant la phase

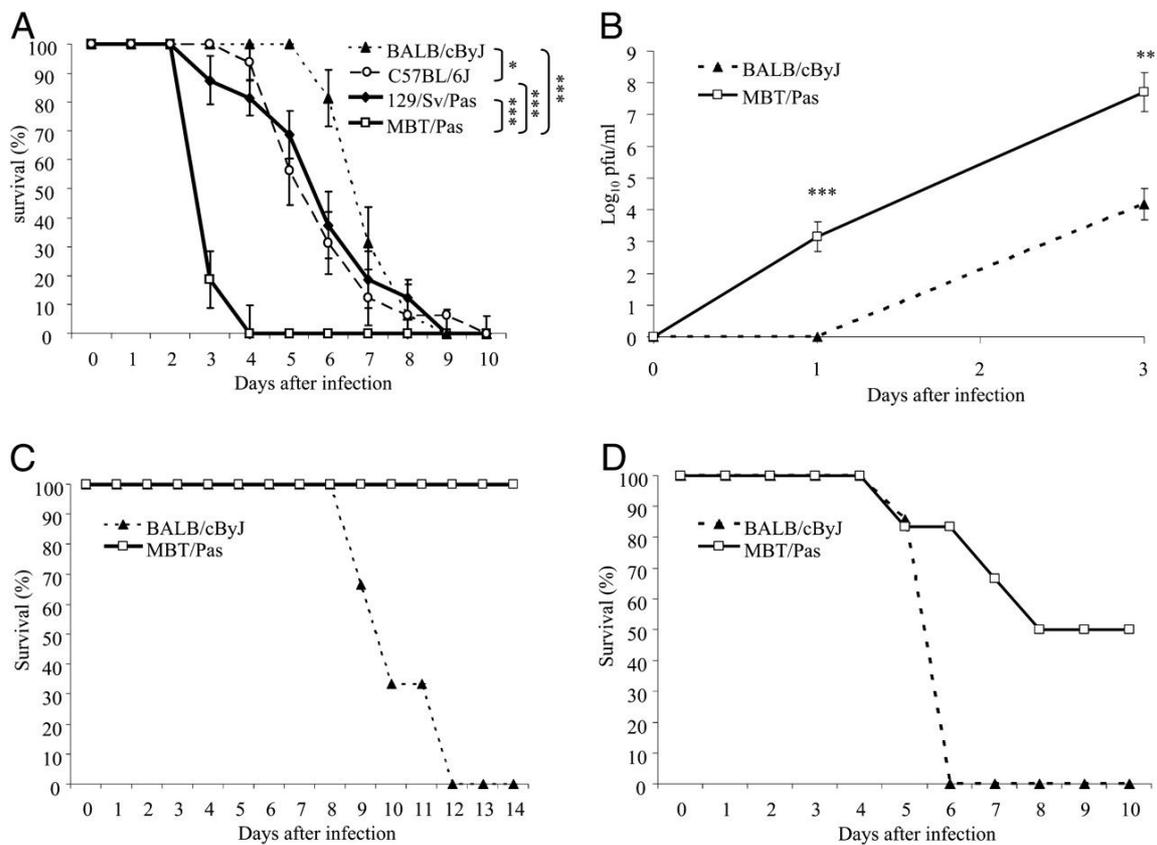


Figure 7: Survie et analyse virologique de souris consanguines après des infections virales.

(A) Des cohortes de 15 mâles des lignées consanguines BALB/c, C57BL/6J, 129/Sv/Pas et MBT ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 10^2 PFUs de la souche virulante du VFVR, ZH548. La mortalité des souris a été surveillée tous les jours pendant les 14 jours de l'expérience.

(B) La virémie dans les souris BALB/c et MBT après l'infection avec le VFVR.

(C) Des cohortes de 8 mâles des lignées BALB/c et MBT ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec le virus West Nile IS-98-ST.

(D) Des cohortes de 8 mâles des lignées BALB/c et MBT ont été inoculées par voie intranasale avec la souche adaptée à la souris PR8-Fre du virus Influenza A. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$.

(do Valle et al., 2010)

initiale de l'infection. La réplication du VFVR dans les cellules phagocytaires semble être essentielle pour la dissémination virale et la progression rapide de la maladie.

Enfin, au sein du laboratoire, une étude menée par Tania Zaverucha do Valle (2010) a consisté à comparer la sensibilité à l'infection de différentes lignées consanguines de souris utilisées communément dans le laboratoire. Parmi les lignées étudiées comptaient des lignées classiques de laboratoire et des lignées dérivées de couples capturés dans la nature. Des cohortes de 15 souris de chaque lignée ont été infectées avec 10^2 PFUs de la souche virulente ZH548 isolée à partir d'un patient humain lors de l'épidémie égyptienne de 1977. Cette étude a démontré la variabilité phénotypique entre les lignées consanguines de souris et l'influence du fonds génétique sur la réponse de l'hôte à l'infection par le VFVR (do Valle et al., 2010). Une variabilité moins importante a été observée parmi les lignées classiques de laboratoire (**Figure 7**) qui partagent une histoire évolutive commune et sont donc génétiquement moins divergentes.

Les chercheurs ont identifié deux lignées ayant les réponses les plus distinctes à l'infection : la lignée MBT/Pas (MBT), dérivée de souris sauvages qui présentent une sensibilité accrue au VFVR (les souris MBT meurent 72h après une infection) et la lignée BALB/cByJ (BALB/c), une lignée classique de laboratoire qui est relativement résistante (médiane de survie de 7 jours). La sensibilité de la lignée MBT ne semble pas être due à une immunodéficience généralisée qui leur confèrerait une sensibilité aux infections virales. En effet, les souris MBT sont résistantes à une infection par les virus West Nile et Influenza A, qui provoquent la mort des souris BALB/c (**Figure 7**). La variation de la sensibilité au VFVR entre les deux lignées se traduit également par une virémie et un niveau de transaminases plus élevés chez les souris MBT. Ces deux variables étaient particulièrement élevées lors de la phase précoce de l'infection des souris MBT, ce qui suggère une réponse antivirale innée spécifique au VFVR moins efficace chez ces souris. Cette hypothèse a été approfondie à travers la comparaison de la réponse à l'interféron dans des fibroblastes embryonnaires (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*) dérivés des deux lignées, MBT et BALB/c. Contrairement aux cellules dérivées des souris BALB/c, les cellules d'origine MBT infectées par le VFVR ont développé une réponse immune innée antivirale faible et incomplète. Ces résultats indiquent que lorsque des souris MBT sont infectées par le VFVR, une réponse insuffisante à l'interféron permet la réplication rapide et efficace du virus dans les cellules. Cela contribue à la dissémination du virus dans l'organisme et à la mort précoce des souris.

*

Bien que les études chez le Rat et la Souris accordent une importance majeure au fonds génétique dans la réponse de l'hôte à l'infection par le VFVR, les facteurs génétiques impliqués dans la réponse au VFVR sont peu connus. Pourtant, les modèles murins développés pour la FVR constituent une opportunité pour la recherche de gènes ayant un effet sur l'évolution et l'issue de la maladie. C'est pourquoi de nouvelles études chez la Souris, ciblant spécifiquement la variation génétique entre des lignées de phénotypes différents, sont pertinentes. Elles devraient permettre une meilleure compréhension des voies de signalisation cellulaire et des mécanismes impliqués dans la résistance à la FVR.

« [Prométhée :] *Voilà les inventions que j'ai imaginées en faveur des mortels (...)* »¹⁵

POURQUOI LA SOURIS ?

Les modèles animaux utilisés pour l'étude des maladies infectieuses humaines n'ont pas besoin d'être complètement fidèles ou de récapituler l'infection telle qu'elle existe dans la nature (Guenet, 2011). En réalité, les organismes modèles doivent plutôt être considérés comme un complément aux études cliniques et épidémiologiques réalisées chez l'Homme lors des épidémies naturelles. Ils permettent de répondre à des questions précises et de donner des pistes sur les mécanismes biologiques impliqués dans la réponse de l'Homme à l'infection (Hunter and Crawford, 2008).

Cette réflexion sur l'utilisation des modèles animaux nous amène à deux conclusions principales : i) le choix d'un modèle animal pertinent pour la recherche dépend entièrement de la question posée et de la méthodologie choisie pour y répondre ; et ii) chaque organisme modèle présente des avantages et des limites pour toute question biologique. Il appartient à l'expérimentateur de les évaluer et de choisir le meilleur compromis.

1 La Souris et les maladies infectieuses

Le modèle murin est le modèle de référence pour l'étude de beaucoup de questions liées à la biologie humaine, comme le cancer et l'immunologie. Il l'est aussi pour un grand nombre de maladies infectieuses et notamment la réponse immunitaire de l'hôte aux infections (Guenet, 2011).

On remarquera d'ailleurs que la contribution de la Souris à la Génétique compte des exemples historiques comme la découverte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par George D. Snell (Snell, 1948) qui lui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1980. D'autres gènes majeurs impliqués dans la sensibilité des Mammifères à des pathogènes et parfois conservés chez l'ensemble des vertébrés ont été également caractérisés d'abord chez la Souris. Parmi ces gènes, figurent : le gène *Nramp1* (aujourd'hui renommé *Slc11a1*) qui code un transporteur membranaire d'ions à la surface des macrophages et qui confère à plusieurs espèces animales une résistance à des bactéries pathogènes telles que *Salmonella*

¹⁵Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 436-484

typhimurium, *Leishmania donovani* et *Mycobacterium leprae* (Malo et al., 1994, Blackwell et al., 1994, Skamene, 1994, Fortin et al., 2007); le gène *Ipr1*, identifié comme critique dans la résistance à *Mycobacterium tuberculosis* (Pan et al., 2005) et codant un facteur de transcription qui induit l'apoptose des macrophages infectés ; le gène *Oas1b* qui porte une mutation faux-sens dans la plupart des lignées de souris de laboratoire les rendant sensibles au virus West Nile (Perelygin et al., 2002, Mashimo et al., 2002) ; ou le gène *Tlr4*, découvert par le groupe de Bruce Beutler, codant un récepteur de l'hôte qui reconnaît le composant lipopolysaccharide de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Poltorak et al., 1998). Il est intéressant de noter que tous les gènes susmentionnés ont été *a posteriori* identifiés chez l'Homme comme jouant un rôle important lors des infections. Des études d'association ont en effet détecté des polymorphismes présents dans les populations humaines et modulant la réponse aux différents pathogènes (Greenwood et al., 2000, Miller et al., 2005, Lim et al., 2009, Vidal et al., 2008).

2 Un modèle adapté à l'étude de la génétique de la FVR

Le chapitre précédent (voir page 53) a illustré la pertinence de l'utilisation du modèle murin pour caractériser les maladies provoquées par une infection du VFVR. Outre le phénotype décrit, la Souris possède des caractéristiques pratiques qui rendent son utilisation convenable pour les approches utilisées.

Tout d'abord, la Souris est un des mammifères les plus petits ; cela permet une manipulation facile, un faible coût de maintenance et un besoin d'espaces vitaux réduits. Ces attributs sont particulièrement avantageux dans l'implémentation des protocoles d'expérimentation du VFVR qui exigent un environnement de biosécurité de niveau 3.

De plus, les souris ont un temps de génération relativement court pour un mammifère, soit environ 9 semaines de la fécondation à l'état adulte, et des portées de grande taille pouvant aller de 5 à 10 souriceaux (Panthier et al., 2003, Guenet and Bonhomme, 2003). Ces deux caractéristiques essentielles en génétique permettent l'établissement de lignées génétiques de référence et de souris transgéniques en des temps records. Une lignée est dite congénique après 10 générations de croisements en retour, soit environ 2 ans. Une lignée transgénique fabriquée par la technologie CRISPR/Cas9 peut être établie en 6 mois.

La génétique de la Souris bénéficie encore de la tolérance remarquable des souris à la consanguinité (Guenet and Bonhomme, 2003). Contrairement à beaucoup d'autres espèces de mammifères, les souris peuvent être accouplées entre frère et sœur de manière ininterrompue sans que cela réduise de façon rédhibitoire la *fitness* évolutive des populations et entraîne des maladies ou malformations génétiques, comme cela arrive par exemple chez l'Homme. L'état élevé de consanguinité de la majorité des lignées de souris de laboratoire permet un contrôle très fin des variables génétiques étudiées.

D'autres caractéristiques telles que la facilité de contrôler les variations de l'environnement ou l'accès à des conditions d'asepsie jouent un rôle dans le choix du modèle murin pour l'étude des maladies infectieuses.

*

Bien que l'Homme et la Souris eussent divergé il y a environ 60 millions d'années (Panthier et al., 2003), aujourd'hui ils partagent encore 90% de régions de synténie conservée entre leurs génomes et 80% des gènes de la Souris possèdent un orthologue unique dans le génome humain (Mouse Genome Sequencing et al., 2002). Lors même que les gènes impliqués dans la sensibilité de l'un ne sont pas les mêmes dans l'autre espèce, les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires de la réponse aux pathogènes sont souvent conservés chez les Mammifères (Vidal et al., 2008). C'est pourquoi les études faites chez la Souris apportent des informations de grande valeur pour la biologie de l'Homme.

« Il fut un temps (...) où les races mortelles n'existaient pas.
Lorsque fut venu le temps de leurs naissance (...) les dieux les façonnent à l'intérieur de la terre, en réalisant un mélange de feu, de terre et de tout ce qui se mêle au feu et à la terre.»¹⁶

QUELLES SONT LES ORIGINES DE LA SOURIS ?

Les études génétiques menées chez la Souris tirent parti d'un long répertoire de lignées consanguines bien caractérisées et génétiquement différentes. C'est pourquoi on ne pourra pas comprendre la structure génétique des populations de souris de laboratoire sans connaître leurs histoires évolutives et leurs relations taxonomiques. Ce chapitre ne prétend donner qu'une idée générale des origines et de la taxonomie de la Souris telles que nous les connaissons aujourd'hui.

*

La Souris est un mammifère de petite taille qui appartient à l'ordre des Rongeurs. La désignation *Rodentia* (litt. « ceux qui rongent ») est attribuée au naturaliste anglais Thomas Edward Bowdich (1821) et elle inclut les cobayes, les castors, les porcs-épics, les rats, entre autres (Carleton and Musser, 2005). Les rats et les souris appartiennent, respectivement, aux genres *Rattus* et *Mus* de la famille des muridés. La séparation phylogénétique entre les genres *Rattus* et *Mus* est survenue il y a environ 10 millions d'années et les premiers fossiles dénotant des caractéristiques morphologiques spécifiques du genre *Mus* datent d'il y a 5 millions d'années (**Figure 8**) (Guenet and Bonhomme, 2003, Panthier et al., 2003).

1 Le genre *Mus*

D'après les données paléontologiques, le genre *Mus* est apparu au milieu du Pliocène dans le sous-continent indien. Au fil du temps, les espèces du genre *Mus* se sont répandues sur toute la masse continentale eurasiatique en partie à la suite des changements écologiques introduits par les sociétés humaines. Plus récemment, en suivant les migrations des populations européennes, notamment les voyages maritimes au lendemain de l'âge des découvertes, les souris se sont étendues à tout le globe terrestre (**Figure 9**).

¹⁶ Platon, *Protagoras*, 320c-320e

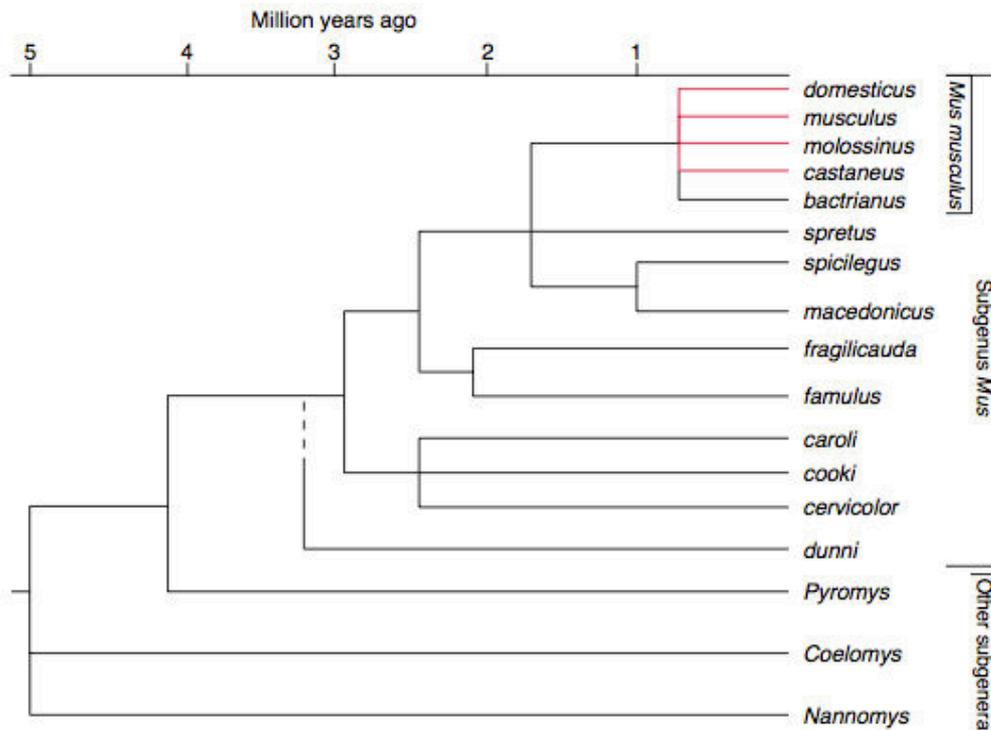


Figure 8: Arbre phylogénétique du genre *Mus*.

L'émergence du genre *Mus* a eu lieu il y a environ 5 millions d'années et correspond à la séparation de différents sous-genres: *Nannomys*, *Coelomys* et *Pyromys*. Ensuite, il y a 3 millions d'années, le sous-genre *Mus* a bifurqué en deux branches: i) les trois espèces asiatiques, *Mus cervicolor*, *Mus cookii* and *Mus caroli*; ii) la branche à l'origine de la souris commune (*Mus musculus*) et de cinq autres espèces congénériques. Ces dernières se sont enfin séparées de l'espèce *Mus musculus* à deux moments différents: *Mus famulus* et *Mus fragilicauda* (~2 millions d'années); *Mus spretus* – souris de la Méditerranée Occidentale –, *Mus spicilegus* – présente en Europe Centrale – et *Mus macedonicus* – de la Méditerranée Orientale – (~1,5 millions d'années). Le dernier nœud de la phylogénie représente l'espèce complexe *Mus musculus*. Les espèces à l'origine des lignées classiques de laboratoire sont colorées en rouge.

(Guenet and Bonhomme, 2003)

Grâce au travail des évolutionnistes et aux approches de la biologie moléculaire, la taxonomie des différentes espèces du genre *Mus* (**Figure 8**) a été clarifiée et elle est désormais bien connue (Guenet and Bonhomme, 2003). Les espèces de souris se distinguent non seulement au niveau moléculaire, mais aussi par des différences morphologiques, de répartition géographique, de comportement et par un isolement reproductif. L'isolement reproductif n'est pas toujours vérifié et des individus d'espèces différentes, habitant les mêmes territoires, peuvent engendrer des hybrides viables et fertiles et établir ce que nous appelons des zones d'hybridation.

Parmi les 10 espèces connues, une seule espèce du genre *Mus* occupe une place prépondérante dans la recherche, l'espèce *Mus musculus*. En effet, la grande majorité des lignées de souris utilisées aujourd'hui dans les laboratoires du monde entier appartiennent à cette espèce. L'espèce *Mus musculus*, originaire du nord de l'Inde et apparue il y a un peu plus d'un million d'années, a progressivement divergé à l'occasion de différentes migrations vers l'Occident et vers l'Orient donnant naissance à 5 sous-espèces (**Figure 9**) :

i) les souris *Mus musculus* qui ont accompagné les migrations des populations humaines de l'Asie centrale vers l'Europe de l'Ouest et l'Afrique du Nord ont formé la sous-espèce *Mus musculus domesticus*. Dans un second temps, les voyages maritimes des nations européennes les ont amenées aux Amériques, en Australie et dans le Pacifique sud.

ii) un autre groupe de souris, qui a colonisé les vastes territoires des steppes eurasiatiques s'étendant de l'Europe de l'Est jusqu'à l'Extrême-Orient de la Chine et de la Russie, constitue la sous-espèce *Mus musculus musculus*.

iii) le groupe de souris qui s'est implanté dans le Sud-Est asiatique (Sri Lanka, Malaisie, Viêt Nam) a donné naissance à la sous-espèce *Mus musculus castaneus*.

iv) le groupe *Mus musculus bactrianus* est apparu en Iran, au Pakistan et en Inde.

v) enfin, la superposition des aires de répartition de *M. musculus musculus* et *M. musculus castaneus* dans l'archipel japonais a favorisé l'hybridation des deux sous-espèces entraînant la formation d'une nouvelle sous-espèce, *Mus musculus molossinus*.

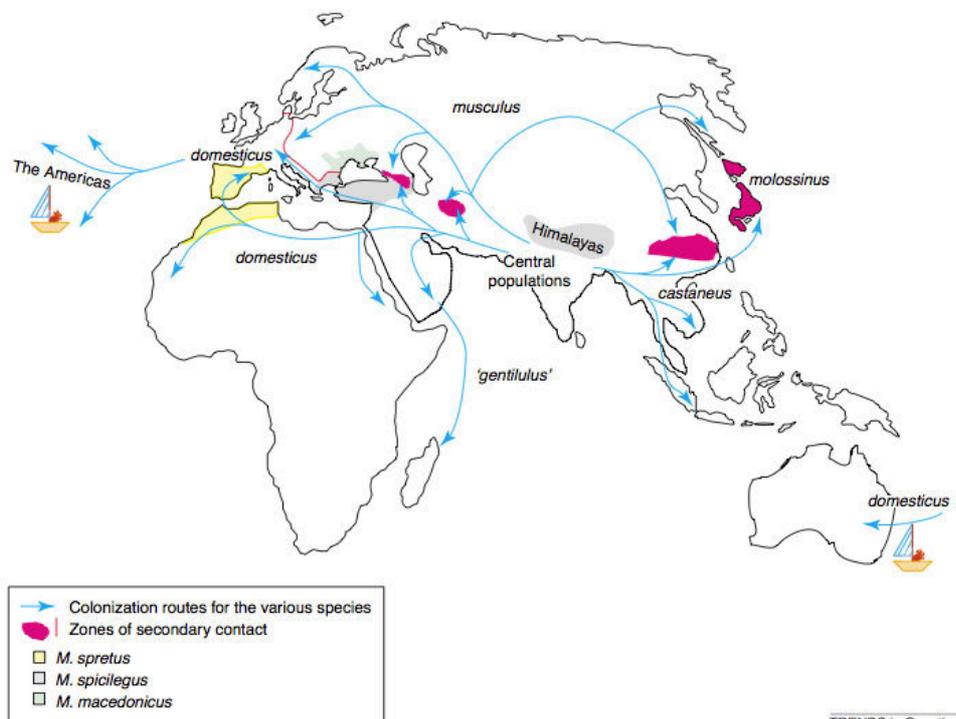


Figure 9: Distribution géographique des différentes espèces du genre *Mus* et des routes de colonisation correspondantes.

Les voies de migration des souris à partir du sous-continent indien, où se trouve le berceau du genre *Mus*, sont indiquées. Flèche bleue: route de colonisation des différentes espèces; Régions roses: zones de contact secondaire et hybridation.

(Guenet and Bonhomme, 2003)

« [Prométhée :] *J'ai défini (...) les mœurs de chaque race (...) leurs amitiés, leurs réunions (...)* et la couleur qu'ils doivent avoir pour plaire aux dieux »¹⁷

LIGNÉES CLASSIQUES OU LIGNÉES SAUVAGES ?

1 Les lignées classiques de souris de laboratoire

Les premiers témoignages écrits faisant référence à l'élevage de souris comme animaux de compagnie remontent aux civilisations de l'âge du bronze de l'Extrême-Orient. Cependant, c'est plusieurs millénaires plus tard, au XVII^e siècle, durant la période Edo au Japon, que la culture de collection de souris de coloration de pelage différentes, les « *fancy mice* », est devenue populaire. Cette pratique a enfin été introduite en Europe par l'Angleterre victorienne de la fin du XIX^e siècle à la faveur des activités commerciales soutenues avec l'Extrême-Orient (Panthier et al., 2003, Royer, 2015).

Les souris de compagnie d'origine japonaise ont alors été croisées avec des souris de l'Europe occidentale (**Figure 10**) qui appartiennent à la sous-espèce *M. m. domesticus* (Takada et al., 2013). Ce sont ces populations hybrides qui ont commencé à être utilisées en Europe et aux Etats-Unis pour les toutes premières expériences sur des souris, à l'aube des sciences biologiques. C'est ainsi qu'en 1902, un biologiste français, Lucien Cuénot, inspiré par la redécouverte des travaux de Mendel et les débuts de la Génétique, a démontré que les lois de Mendel s'appliquent aussi aux souris et par extension aux Mammifères (Cuénot, 1902). Cette date marque le début de la génétique de la Souris. A partir de 1902, l'utilisation des souris comme outil d'études de génétique a connu une grande popularité.

Dans les années 1910 dans le Massachussets, Abbie E.C. Lathrop, une institutrice à la retraite, a commencé à croiser des souris de différentes provenances et à établir des lignées consanguines pour faire du commerce avec des institutions scientifiques. Les souris de Mme Lathrop ont été les progéniteurs des premières lignées consanguines de souris de laboratoire que nous appelons aujourd'hui les lignées classiques (Steensma et al., 2010).

¹⁷ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 485-528

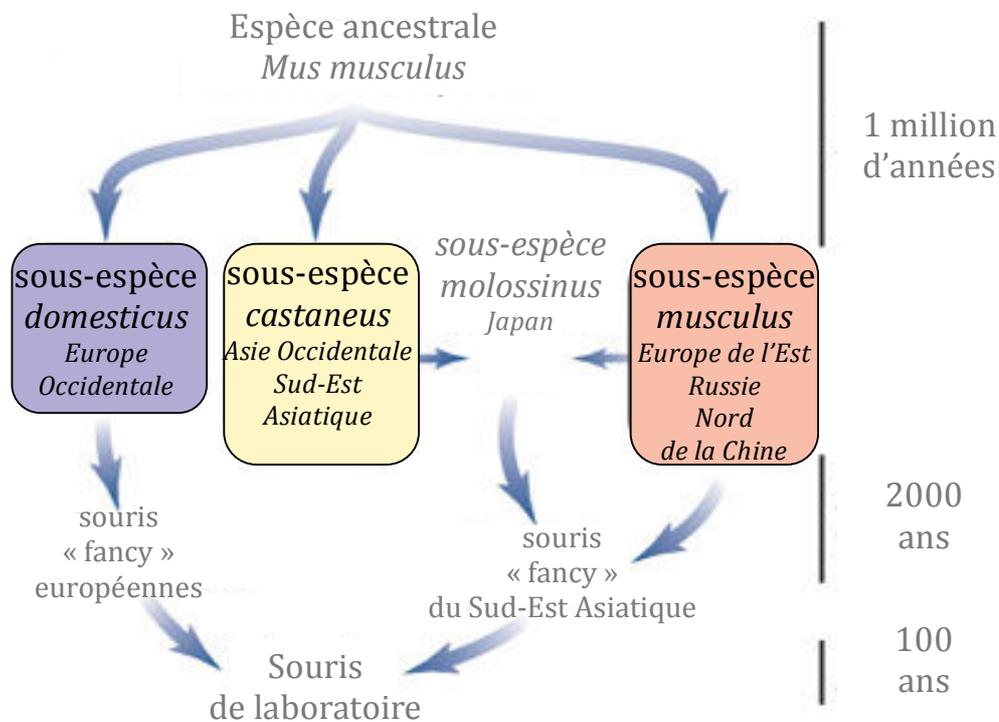


Figure 10: Histoire des souris consanguines de laboratoire.

Les souris classiques de laboratoire ont été dérivées des souris « *fancy* » européennes et asiatiques, entretenues par quelques éleveurs. C'est pourquoi les sous-espèces de l'Europe Occidentale (*M. m. domesticus*, violet), de l'Europe de l'Est et Asie Centrale (*M. m. musculus*, orange) et du Sud-Est Asiatique (*M. m. castaneus*, jaune) ont contribué à la structure génétique des souris consanguines de laboratoire.

D'après Wade et al, 2002.

A partir d'une poignée de souris achetées à Mme Lathrop et tout au long des cent dernières années, les généticiens de la souris ont développé plusieurs centaines de lignées consanguines différentes.

La lignée C57BL/6 de pelage noir (« Black 6 ») et dérivée à partir du clone 57 de Mme Lathrop est devenue la lignée la plus communément utilisée dans la recherche scientifique. C'est pourquoi, en 2009, C57BL/6 a été le deuxième mammifère et la première lignée de souris à avoir son génome entièrement séquencé. Depuis lors, la séquence génomique assemblée de C57BL/6 est considérée comme la séquence de référence pour les génomes de souris (Mouse Genome Sequencing et al., 2002).

La lignée BALB/c, qui ne provient pas des élevages de Mme Lathrop, est elle aussi très utilisée en laboratoire et facilement reconnue grâce à son albinisme caractéristique (pelage blanc et yeux rouges). Le génome de la sous-lignée BALB/cJ a été entièrement séquencé en 2012 par le *Welcome Trust Sanger Institute* (Hinxton, Grande-Bretagne) (Keane et al., 2011, Yalcin et al., 2011).

*

Les détails de la sélection artificielle à laquelle les souris de laboratoire ont été assujetties au long de leur histoire révèlent la complexité et l'hétérogénéité de la structure génétique des lignées consanguines (**Figure 10**). En effet, les lignées classiques de laboratoire sont regardées comme des hybrides des trois sous-espèces *M. m. domesticus*, *M. m. musculus* et *M. m. castaneus* (Yang et al., 2007, Wade et al., 2002).

1.1 Composition génétique des lignées classiques de laboratoire

Conscients du mosaïcisme du génome des lignées classiques, différents groupes de généticiens ont voulu déterminer précisément l'origine génétique des différentes régions génomiques dans ces lignées à l'aide des nouvelles technologies de génotypage et de séquençage à haut-débit.

Ces études ont montré que toutes les lignées classiques de laboratoire ont hérité de l'ADN mitochondrial de la sous-espèce *M. m. domesticus* et du chromosome Y de *M. m. musculus*. En revanche, l'origine des autosomes et du chromosome X est beaucoup plus

hétérogène parmi les lignées. Les études les plus récentes ont indiqué qu'en moyenne 90% du génome provient de progéniteurs *M. m. domesticus*, 5 à 7% de progéniteurs *M. m. musculus* et moins de 2% de *M. m. castaneus* (Frazer et al., 2007, Wade et al., 2002, Yang et al., 2007, Yang et al., 2011).

*

Du petit nombre de progéniteurs à l'origine des souris classiques de laboratoire résulte une conservation importante de leurs génomes et ainsi une diversité génétique très réduite en regard de celle qui existe dans l'espèce *M. musculus* (Guenet and Bonhomme, 2003).

2 Les lignées sauvages

Pendant la deuxième partie du XX^e siècle, les généticiens de la souris, intrigués par l'histoire évolutive et la diversité de l'espèce *Mus musculus*, ont commencé à capturer des individus sauvages dans diverses régions d'Europe et d'Asie afin d'établir des colonies stables et consanguines au laboratoire (Guenet and Bonhomme, 2003).

Parmi les modèles murins pour la FVR mentionnés précédemment, la souris MBT/Pas est la seule lignée dite sauvage puisqu'elle a été dérivée à partir de progéniteurs de l'espèce *M. m. musculus* capturés en Bulgarie en 1980.

D'autres lignées sauvages dérivées de *M. m. musculus* n'ont pas encore été testées pour leur sensibilité à la FVR, en particulier PWK/Pas et PWK/PhJ. Un seul couple de progéniteurs, capturés dans les environs de Prague, est à l'origine de ces deux lignées, bien qu'elles aient probablement divergé depuis leur création.

*

L'établissement de nouvelles lignées de laboratoire dérivées de progéniteurs sauvages s'est traduit par la disponibilité pour les chercheurs de nouveaux polymorphismes génétiques, absents des populations classiques (Guenet and Bonhomme, 2003). La nouveauté génétique est responsable d'une variabilité phénotypique plus importante dont les chercheurs peuvent se servir pour identifier de nouvelles fonctions géniques.

DIVISIO

OU

OBJECTIFS

*« Autrefois ils voyaient sans voir, écoutaient sans entendre (...)
ils faisaient tout sans user de leur intelligence,
jusqu'au jour où je [Prométhée] leur montrai l'art (...)
tous les arts des mortels viennent de Prométhée. »¹⁸*

¹⁸ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 436-484

S'il fallait trouver une seule conclusion pour l'ensemble des études portant sur la pathogénèse de la fièvre de la Vallée du Rift depuis sa découverte jusqu'à nos jours, ce serait indubitablement la forte influence des facteurs génétiques de l'hôte sur l'évolution et le dénouement de cette maladie.

Malgré le caractère répétitif de cette observation au long des 80 dernières années, aucune étude n'a mis en évidence de nouveaux facteurs génétiques spécifiquement associés à une résistance accrue au VFVR.

Les travaux de notre laboratoire ont pour but d'identifier de nouveaux gènes de l'hôte impliqués dans la réponse aux maladies infectieuses. C'est ainsi que nous sommes intéressés à l'étude de la FVR et sommes partis à la découverte de nouveaux composants de la réponse antivirale chez la Souris.

Tânia Zaverucha do Valle (2010) avait décrit pour la première fois un modèle murin sauvage, la lignée MBT/Pas, extrêmement sensible à de faibles doses de VFVR qui ne provoquent qu'une mort tardive chez les souris classiques de laboratoire. Elle s'est alors intéressée aux variants génétiques qui confèrent aux souris MBT cette sensibilité. Afin de détecter des régions du génome associées aux différences de résistance entre MBT et BALB/c, elle a été à l'initiative, en collaboration avec Satoko Tokuda, d'une étude de cartographie de *Quantitative Trait Locus* (QTL).

Dans la continuité des analyses menées par Tânia et Satoko, l'objectif de mon travail est l'identification de gènes clés, de voies de signalisation et/ou de mécanismes physiopathologiques essentiels pour la pathogénicité et la résistance au VFVR.

Nous avons combiné des données de cartographie QTL, d'infection *in vivo* et *in vitro*, de pathophysiologie, de dissection génétique, de séquençage et de transcriptomique qui nous ont permis de réduire considérablement le nombre de gènes candidats dans une région clairement associée à une résistance à la FVR. Par ailleurs, nous avons entrepris de caractériser l'étiologie de la sensibilité à la FVR observée chez les souris MBT.

CONFIRMATIO

OU

RÉSULTATS

*« Voilà pourquoi je [Prométhée] suis courbé sous le poids de ces
douleurs pénibles à supporter, pitoyables à voir.
Pour avoir eu pitié des mortels, j'ai été jugé indigne de pitié,
et voilà l'impitoyable traitement qu'on m'inflige,
spectacle déshonorant pour Zeus. »¹⁹*

¹⁹ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 197-246

Dans la partie suivante, je décrirai en détail les résultats obtenus au long des trois dernières années de thèse.

Elle est divisée en 4 chapitres qui sont précisés ci-dessous :

Chapitre I : L'identification des *Quantitative Trait Loci* (QTLs)

Le premier chapitre consiste en un article publié en Janvier 2015 sous le titre traduit en français : « Les bases génétiques de la sensibilité à la maladie de la fièvre de la Vallée du Rift chez les souris MBT/Pas ».

L'article traite de l'identification de locus associés à la sensibilité à la FVR par une stratégie de cartographie de QTL sur une population F2.

Chapitre II : La caractérisation de la pathogenèse de la FVR

À l'instar du chapitre précédent, le deuxième chapitre est présenté sous format d'article sous le titre traduit en français : « Dissection génétique de la pathogenèse de la fièvre de la Vallée du Rift : *Ryfs2* sur le chromosome 11 affecte la tolérance à l'hépatite précoce ».

L'article qui sera soumis prochainement rapporte l'évolution détaillée de la maladie chez les souris de la lignée consanguine parentale BALB/c et de la lignée congénique C.MBT-*Ryfs2*, qui portent un segment de chromosome 11 d'origine MBT/Pas dans un fonds génétique BALB/c.

Chapitre III : La dissection génétique de l'intervalle

Quant au troisième chapitre, il traite de l'approche génétique utilisée pour réduire la région critique d'origine MBT/Pas portée par les souris C.MBT-*Ryfs2*. Nous sommes partis d'une région d'environ 19 cM comprenant 458 gènes et l'avons réduite à moins de 5 cM avec 88 gènes.

Chapitre IV : La recherche des gènes candidats

Dans ce quatrième chapitre, je présente les stratégies bioinformatiques mises en place dans le but d'identifier les meilleurs gènes candidats à même d'expliquer la sensibilité des souris congéniques *C.MBT-Rvfs2*.

Ce chapitre comprend une grande diversité d'analyses qui recouvrent :

- ❖ la détection de variants de structure à partir des données de séquençage à haut-débit ;
- ❖ la prédiction de la sévérité de SNPs faux-sens ;
- ❖ l'identification de variants de régulation par des approches transcriptomiques,
- ❖ le croisement des données bio-informatiques et des données fonctionnelles
- ❖ l'établissement d'une liste de gènes candidats.

« [Io :] *Que dis-tu ? Un fils issu de moi te délivrera de tes maux ?*
[Prométhée:] *Oui, à la troisième génération après les dix premières.* »²⁰

L'IDENTIFICATION DES QUANTITATIVE TRAIT LOCI (QTL)

La découverte de deux lignées de souris consanguines, MBT et BALB/c, qui présentent deux sensibilités très différentes, l'une précoce, l'autre tardive, à la fièvre de la Vallée du Rift (do Valle et al., 2010), a confirmé que le fonds génétique module chez la Souris la progression de l'infection et donc de la maladie.

Cette observation suscite une question : « Quels sont les facteurs génétiques responsables d'une telle différence ? »

L'article présenté ci-après, auquel j'ai participé activement au cours de ma première année de thèse, ne prétend pas à y répondre entièrement, mais vise plutôt l'identification d'intervalles où se situent les facteurs génétiques à effet majeur, l'analyse de leurs interactions (additives ou épistatiques) et la confirmation *in vivo* de l'effet individuel de chaque intervalle.

1 Résultats Principaux

1.1 Les intervalles génétiques

Nous avons réalisé une cartographie de QTL sur une population de deuxième génération (F2, N=546 souris) infectée par la souche virulente du VFVR, ZH548, et issue du croisement de femelles BALB/c avec des mâles MBT. Les souris ont été génotypées pour 259 marqueurs distribués sur les autosomes et le chromosome X. Nous avons identifié 2 intervalles génétiques (QTLs) significatifs sur les chromosomes 2 et 11, et un intervalle suggestif sur le chromosome 5. Sous un modèle non-paramétrique, les valeurs de LOD scores associées sont égales à 4,58, 2,99 et 2,95, respectivement. Les locus ont été nommés *Rift Valley fever susceptibility (Rvfs) -1, -2, -3* selon l'ordre décroissant des LOD scores.

²⁰ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 764-797

1.2 L'interaction génétique

L'analyse statistique des interactions génétiques des QTLs a identifié des effets additifs significatifs entre *Rvfs1* (Chr2) et *Rvfs2* (Chr11) et suggestifs entre *Rvfs2* (Chr11) et *Rvfs3* (Chr5). Aucune interaction épistatique n'a été détectée. Ces données ont permis de proposer un modèle additif de QTLs multiples et de déterminer la part de la variance phénotypique expliquée par les trois locus identifiés dans la population F2. Les trois QTLs expliquent 8,3% de la variance phénotypique, le covariant « sexe des souris » en explique 10%.

1.3 Les lignées congéniques

Pour conclure cette étude, nous avons voulu confirmer l'effet individuel de chaque locus *in vivo*. Des lignées congéniques, dérivées de l'introgession de chaque QTL d'origine MBT dans un fonds génétique BALB (C.MBT-*Rvfs*), ont été établies et testées pour leur sensibilité au VFVR.

Seule la lignée congénique porteuse de la région *Rvfs2* (C.MBT-*Rvfs2*) a présenté une sensibilité précoce à la FVR dans les deux sexes. Alors que les femelles C.MBT-*Rvfs1* sont décédées significativement plus tôt que les femelles BALB/c, aucune différence n'a été observée entre les mâles. Dans la lignée C.MBT-*Rvfs3*, les mâles sont morts significativement plus tôt que les mâles BALB/c, tandis que les femelles sont décédées plus tard. Nous concluons que *Rvfs1* et *Rvfs3* ont un effet qui dépend du sexe des souris infectées.

ORIGINAL ARTICLE

The genetic basis for susceptibility to Rift Valley fever disease in MBT/Pas mice

S Tokuda^{1,2,7}, TZ Do Valle^{1,2,3,7}, L Batista^{1,2,4}, D Simon-Chazottes^{1,2}, L Guillemot^{1,2}, M Bouloy⁵, M Flamand⁶, X Montagutelli^{1,2} and J-J Panthier^{1,2}

The large variation in individual response to infection with Rift Valley fever virus (RVFV) suggests that host genetic determinants play a role in determining virus-induced disease outcomes. These genetic factors are still unknown. The systemic inoculation of mice with RVFV reproduces major pathological features of severe human disease, notably the hepatitis and encephalitis. A genome scan performed on 546 (BALB/c × MBT) F2 progeny identified three quantitative trait loci (QTLs), denoted *Rvfs-1* to *Rvfs-3*, that were associated with disease susceptibility in MBT/Pas mice. Non-parametric interval-mapping revealed one significant and two suggestive linkages with survival time on chromosomes 2 (*Rvfs-1*), 5 (*Rvfs-3*) and 11 (*Rvfs-2*) with respective logarithm of odds (LOD) scores of 4.58, 2.95 and 2.99. The two-part model, combining survival time and survival/death, identified one significant linkage to *Rvfs-2* and one suggestive linkage to *Rvfs-1* with respective LOD scores of 5.12 and 4.55. Under a multiple model, with additive effects and sex as a covariate, the three QTLs explained 8.3% of the phenotypic variance. Sex had the strongest influence on susceptibility. The contribution of *Rvfs-1*, *Rvfs-2* and *Rvfs-3* to survival time of RVFV-infected mice was further confirmed in congenic mice.

Genes and Immunity (2015) 16, 206–212; doi:10.1038/gene.2014.79; published online 8 January 2015

INTRODUCTION

Rift Valley fever (RVF) is a serious emerging viral zoonosis that primarily affects ruminants and humans. Recurrent outbreaks have been documented in sub-Saharan Africa and have spread outside continental Africa to Madagascar, and the Arabian Peninsula, killing hundreds of thousands of animals and more than a thousand humans.^{1,2} The RVF virus (RVFV), a member of the *Bunyaviridae* family, genus *Phlebovirus*, is mainly transmitted by mosquitoes and causes necrotic hepatitis, hemorrhage and abortions with high mortality among newborn and young animals.³ Humans can also be infected through aerosols or by physical contact with body fluids, and organs of infected animals.^{4,5} Some reports indicated that the disease predominantly affects male patients,⁶ which could result from increased occupational and professional contacts with animals. Most patients suffer a self-limiting, febrile illness. However, a subset of patients develop severe forms characterized by hepatitis with fatal hemorrhagic fever or neurological disorders. The mortality rate has been reported to vary from 1 to 14%.^{7,8} Owing to the possibility of acute disease and the ease of aerosolization of infectious viral particles, RVFV outbreaks and research are carefully monitored by government agencies to prevent its potential use in bioterrorism.⁹

Progress in molecular biology of RVFV has been made during the last decade.^{10,11} The genome of RVFV consists of a single-stranded tripartite RNA (L, M and S segments) of negative-sense or ambisense polarity. The L segment encodes the RNA-dependent RNA polymerase, while the M segment encodes the envelope glycoproteins (Gn/Gc) and the non-structural NSM

protein. The S segment encodes the N nucleocapsid and the NSs nonstructural protein. The NSs protein is the major virulence factor counteracting both the antiviral interferon- β response and the double-stranded RNA-dependent protein kinase activity.^{12–14} Little is known about the natural host factors that influence the progression and severity of RVF disease in humans and animals. The large variation in individual response to the infectious agent suggests the existence of host genetic factors influencing susceptibility to RVF disease.^{1,2} At present, it is impossible to dissect host genetic determinants of RVF severity in humans, or livestock, as no one has access to the large number of cases required for a genome-wide association study. Animal models of RVF disease are needed to perform functional studies in a controlled setting,¹⁵ and to better define genetic susceptibility factors. The susceptibility of rats to RVFV differs among strains.^{16–18} Previous experiments with the rat model indicated a single Mendelian gene with dominant inheritance in the resistance phenotype of Wistar-Furth/mol rats although the underlying polymorphism has not yet been identified.^{19,20}

Mouse models have provided key insights into the biology of human diseases and paved the way for the development of novel therapeutic approaches.²¹ We have previously shown that wild-derived inbred MBT/Pas (MBT) mice are the most susceptible to infection with RVFV virulent strains, whereas BALB/cByJ (BALB/c) mice show the highest resistance among the tested strains.²² Following infection with the wild-type virus strain ZH548, MBT mice exhibited earlier and higher viremia compared with BALB/c mice. Interestingly, the susceptibility of MBT mice to RVF disease seems to be selective because these mice survived an infection

¹Institut Pasteur, Developmental & Stem Cell Biology Department, Mouse functional Genetics, Paris, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique, URA 2578, Paris, France; ³Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil; ⁴Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IFD, Paris, France; ⁵Institut Pasteur, Bunyaviruses Molecular Genetics, Paris, France and ⁶Institut Pasteur, Structural Virology, Paris, France. Correspondence: Professor J-J Panthier, Mouse functional Genetics and CNRS URA 2578, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, Paris 75724, France.

E-mail: jean-jacques.panthier@pasteur.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 30 September 2014; revised 12 November 2014; accepted 13 November 2014; published online 8 January 2015

with either influenza A virus or West Nile virus in conditions where BALB/c mice died.²²

To investigate the inheritance of susceptibility to RVF disease, we used a genome-wide quantitative trait locus (QTL) search strategy. This method does not require prior hypotheses regarding the pathogenesis of the disease. The analysis of survival time identified three QTLs on chromosomes (Chr) 2, 5 and 11, designated Rift Valley fever virus susceptible locus (*Rvfv*s)-1, -3 and -2, respectively. Chromosomal regions spanning the QTLs from the susceptible strain (MBT) were transferred into the resistant recipient (BALB/c) background. Each congenic strain (denoted C.MBT-*Rvfv*s) carries a BALB/c genetic background with only the chromosomal segment encompassing the corresponding *Rvfv*s locus from MBT. Phenotypic differences in the C.MBT-*Rvfv*s-1, -2 and -3 congenic strains relative to BALB/c mice confirmed the effects of the three QTLs. Our data also support the existence of sex-specific genetic variants governing susceptibility to RVFV-induced disease.

RESULTS

Segregation analysis of the RVFV susceptible phenotype in BALB/c and MBT F2 cross

In a previous study, we identified the MBT inbred strain, an inbred derivative of wild caught animals, as highly susceptible to infections with virulent strains of RVFV. When infected intraperitoneally with 100 PFU of RVFV ZH548 strain, most MBT mice died within 3 days whereas BALB/c animals survived longer.²² The difference of susceptibility between MBT and BALB/c mice indicates that host genetic factors control outcomes following infection with RVFV. In our experiments, MBT and BALB/c were considered as the susceptible and resistant strain, respectively. To investigate the mode of inheritance of MBT susceptibility to RVFV infection, we examined the mortality of 116 (BALB/c × MBT) F1 hybrids after RVFV infection (Figure 1a). Significant differences in sex-specific susceptibility were seen in F1 mice, as well as in parental BALB/c and MBT mice, the males were more susceptible than the females (log-rank test; $P < 0.0001$ for BALB/c and F1; $P < 0.001$ for MBT). The F1 population displayed similar survival curves as the BALB/c strain (log-rank test; $P = 0.1490$ and 0.1381 for female and male mice, respectively), whereas they were significantly different from the MBT strain (log-rank test; $P < 0.05$ for both female and male mice). The mean time-to-death in the F1 population (6.20 ± 0.25 and 6.00 ± 0.20 days for females and males) was significantly lower than that of BALB/c mice in both sexes (8.17 ± 0.24 and 6.70 ± 0.21 days for females and males, respectively; surviving animals were not included; one-way analysis of variance with Tukey's *post hoc* test).

F2 progeny were produced, infected with the RVFV and monitored. The F2 population showed intermediate survival curves, significantly different from both parental strains (Figure 1a). Furthermore, the mean time to death of the F2 population showed a continuous distribution within the range of parental phenotypes, suggesting a multigenic control (Figure 1b). Male mice presented a shorter time to death and a higher mortality rate than females in F2 populations (log-rank test; $P < 0.0001$).

Genetic dissection of the susceptible phenotype in BALB/c and MBT F2 intercross

To identify genetic components underlying the susceptibility to RVFV infection in the MBT mice, a whole-genome scan was performed to evaluate 546 (BALB/c × MBT) F2 progeny. A total of 259 polymorphic markers located on all autosomal chromosomes and on the X chromosome were assayed. Out of 546 RVFV-infected mice, 41 individuals (7.5%) survived more than 9 days post infection. To map the QTLs, we applied methods developed

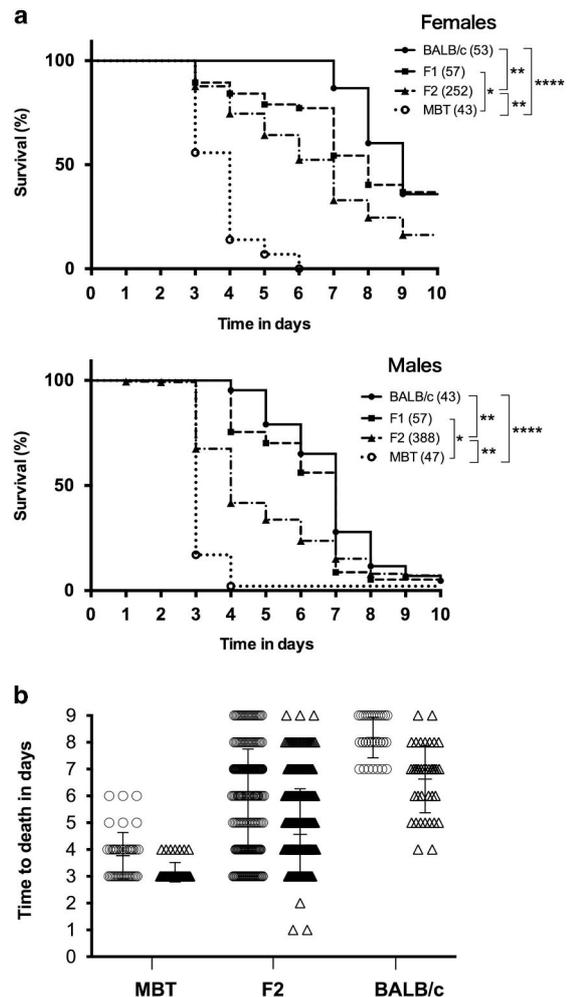


Figure 1. Survival time of BALB/c, MBT, F1 and F2 mice after infection with RVFV ZH548 strain. **(a)** Nine- to 12-week-old BALB/c, MBT, F1 and F2 female and male mice were infected intraperitoneally with 100 PFU of the RVFV ZH548. The survival of individual female (top) and male (bottom) mice was monitored until day 10 post infection. Kaplan–Meier survival plots were recorded (log-rank test; the number of animals per genotype is given within brackets; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$). **(b)** The distribution of F2 population and parental strains after infection with RVFV ZH548. Circles and triangles represent individual female and male mice, respectively. Depicted are the means and s.d. of female ($n = 43$) and male ($n = 46$) MBT mice, female ($n = 211$) and male ($n = 360$) F2 mice, and female ($n = 34$) and male ($n = 40$) BALB/c mice. Animals that survived more than 10 days post infection were not included.

by Broman²³ which account for spikes in the phenotype distribution. A binary analysis of survival/death with sex as a covariate failed to reveal any significant QTLs, probably because of the small number of surviving mice. We performed nonparametric interval-mapping with the time to death after infection as a trait. Surviving mice were excluded, leaving 505 non-surviving animals for analysis. One significant QTL was detected on Chr 2 with the peak logarithm of odds (LOD) score reaching 4.58 at genomic position 168.2 Mb ($P = 0.005$). Two suggestive QTLs were also found on Chr 5 (LOD = 2.95; $P = 0.160$ at genomic position 61.6 Mb) and Chr 11 (LOD = 2.99; $P = 0.154$ at genomic position 113.9 Mb) (Figure 2a). We also applied a two-part model, combining the binary trait (survival/death) and the quantitative trait (survival

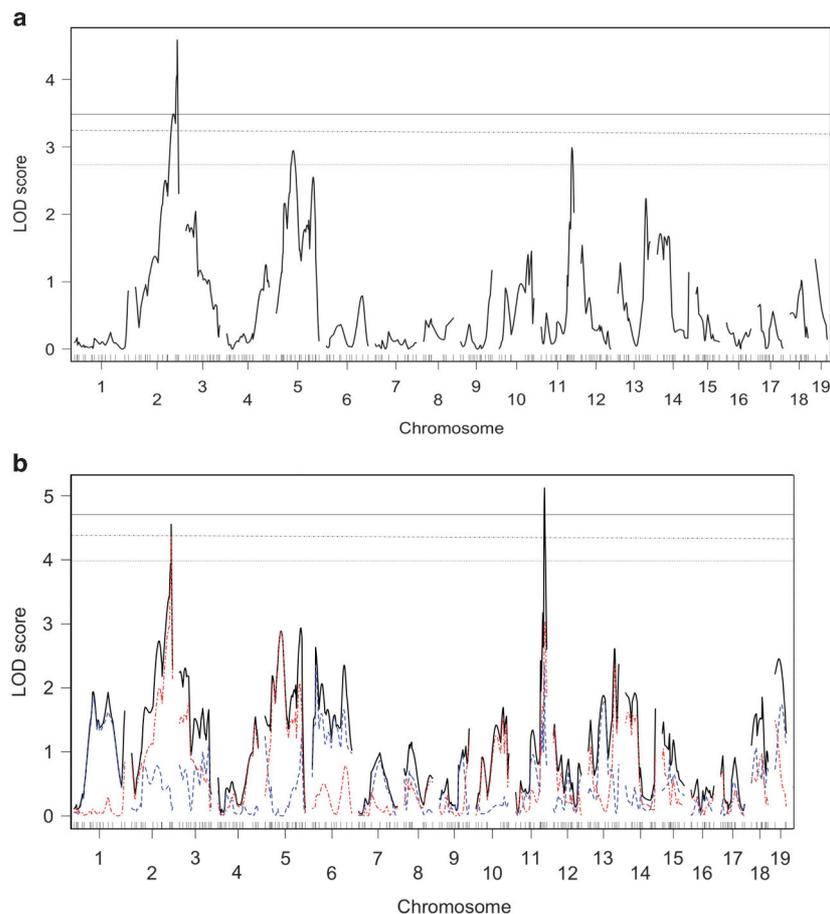


Figure 2. Genome-wide QTL scans for the outcome of RVFV infection in (BALB/c × MBT) F2 mice. A total of 546 F2 animals were genotyped with 259 polymorphic markers, and infected with RVFV ZH548 intraperitoneally. The survival of individual mice was monitored daily for a period of 14 days. **(a)** Nonparametric interval-mapping with the time to death as a trait includes the 505 mice that died. LOD score is plotted as a function of genomic position. One significant locus on chromosome 2 and two suggestive loci on chromosomes 5 and 11 are revealed. **(b)** Two-part model combining the time to death and the binary trait (survived/died) of all 546 F2 animals. The large red dotted line represents the LOD trace for the nonparametric analysis, the small blue dashed line represents the LOD trace for the analysis of the binary trait (survive versus death), and the continuous black line is the sum of the two separate analyses. One significant locus on chromosome 11 and one suggestive locus on chromosome 2 are found. The horizontal lines represent the genome-wide significance thresholds after 1000 permutations (full line, $P=0.05$; long dash, $P=0.1$; small dash, $P=0.2$).

time).²³ One significant and one suggestive QTLs were detected on Chr 11 (LOD=5.12; $P=0.022$ at genomic position 112.8 Mb) and Chr 2 (LOD=4.55; $P=0.075$ at genomic position 168.2 Mb), respectively (Figure 2b). No significant QTLs were detected when these QTL tests were performed on females and males separately. Of note, the loci on Chr 2 and 11 achieved the 5% genome-wide significance level only with the nonparametric interval-mapping and the two-part model, respectively. No QTLs were found on X chromosome which could have contributed to the sex difference in susceptibility.

We then investigated the genetic interactions (additive or epistatic) between the three QTLs, using the scantwo command of R/qtl (Figure 3). This analysis provided evidence for significant additive effects between Chr 2 and 11 (LOD=6.86; $P=0.014$), and between Chr 2 and 5 (LOD=6.73; $P=0.016$). A suggestive additive effect was also detected between Chr 5 and 11 (LOD=5.85; $P=0.089$). There was no evidence for epistatic interactions. To estimate the effect of each QTL on the phenotype, we fitted a multiple-QTL model under the hypothesis that the three QTLs on Chr 2, 5 and 11 contribute additively to the susceptibility to RVFV infection (as measured as the time to death) using sex as a

covariate. As a result, we found that the QTLs collectively explain 8.3% of the phenotypic variance in the F2 population whereas sex had the strongest effect on the phenotype, explaining 10.1% of the variance (Table 1). The three QTLs will be referred to as *Rift Valley fever susceptible locus-1 (Rvfs1)* on Chr 2, *Rvfs2* on Chr 11 and *Rvfs3* on Chr 5. The confidence intervals, based on two-LOD units drop-off from the QTL peaks, were determined by the markers *D2Mit306* and *rs3664044* for *Rvfs1*, *rs13481186* and *D11Mit69* for *Rvfs2*, and *D5Mit125* and *rs4225536* for *Rvfs3* (Table 1).

Derivation and susceptibility of congenic strains

Congenic strains were generated to confirm the individual effects of *Rvfs1*, *Rvfs2* and *Rvfs3* on the susceptibility to the RVFV infection. The critical interval for each of the QTLs was transferred from the MBT genome onto a BALB/c genetic background by at least 10 cycles of backcrossing using marker-assisted introgression. Two heterozygotes were then intercrossed and two homozygous offspring were bred to fix the MBT haplotype of *Rvfs1*, *Rvfs2* and *Rvfs3* on the BALB/c background, resulting in the C.MBT-*Rvfs1*, C.MBT-*Rvfs2* and C.MBT-*Rvfs3* congenic strains. To characterize

precisely the introgressed segments, congenic mice were analyzed using the MegaMUGA platform that includes 77.8K markers.²⁴ The analysis revealed that the MBT segment on Chr 2 in C.MBT-*Rvfs1* spans from a point between 2:164 791 844 and 2:164 836 539 to the end of chromosome. Similarly, the MBT segment on Chr 11 in C.MBT-*Rvfs2* spans from a point between 11:104 823 629 and 11:104 845 860 to the end of chromosome, and on Chr 5 in C.MBT-*Rvfs3* spans from a point between 5:53 334 387 and 5:53 365 815 to a point between 5:120 706 275 and 5:120 737 326 (Figure 4). No unlinked MBT markers were found in the congenic genomes, confirming that only the *Rvfs* chromosomal segments were introgressed onto the BALB/c genetic background.

The three congenic strains were challenged with 100 PFU of RVFV ZH548 strain. In the C.MBT-*Rvfs2* and C.MBT-*Rvfs3* strains, the males were more susceptible than the females (log-rank test; $P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively). Difference in sex-specificity was not significant in C.MBT-*Rvfs1* mice using cohort sizes of 16 females and 20 males. C.MBT-*Rvfs1* females died

significantly earlier than BALB/c females, whereas no significant difference was observed between C.MBT-*Rvfs1* and BALB/c males (Figure 4a). C.MBT-*Rvfs2* mice of both genders died significantly earlier than BALB/c mice (Figure 4b). Finally, C.MBT-*Rvfs3* males died significantly earlier than BALB/c males. These results confirmed the effects of the three QTLs on the susceptible phenotype. Unexpectedly, however, C.MBT-*Rvfs3* females survived significantly longer than BALB/c females, an unexpected result which would require confirmation on a larger cohort (Figure 4c). No significant differences were observed between BALB/c mice and animals heterozygous for the haplotypes of *Rvfs1*, *Rvfs2* or *Rvfs3*. This indicates that these QTLs have recessive effects while on the BALB/c genetic background.

DISCUSSION

Host genetic control of RVF disease in mice

Susceptibility to infectious disease is difficult to assay in humans, and human genome-wide association study would require tens or hundreds of thousands samples of RVFV-infected patients. Mice provide an alternative means of studying RVF disease because they recapitulate the acute-onset hepatitis and delayed-onset encephalitis seen in severe human RVF.²⁵ The current study was designed to assess the effect of polymorphisms in the mouse genome on survival after infection with a virulent strain of the RVFV. As previous attempts to identify an influence of genetic factors in classical laboratory strains have failed,²⁰ we tested the susceptibility of inbred strains derived from progenitors of various *Mus* subspecies, and found that mice of the *Mus m. musculus* derived MBT strain exhibited an extreme susceptibility to RVFV infection.²² We show here that the susceptibility of MBT mice to RVFV infection is a complex trait that is inherited in a multifactorial manner with sex influencing the severity of infection. We identified three host genome regions associated with severity of RVF disease in inbred mice. Each of these QTLs explains between 1.78 and 3.17% of the phenotypic variance. These results are consistent with data from a comprehensive analysis of the genetic architecture of behavioral and physiological phenotypes in the mouse which indicate that most QTLs explain between 1 and 5% of the genetic variance, and only 1% of the QTLs have an effect greater than 5%.²⁶ QTLs with larger effect sizes on survival time following infection were occasionally identified.^{27,28} Altogether, only 8.3% of the phenotypic variance in the (BALB/c × MBT)F2 could be ascribed to genetic determinants meaning that there must be many undetected loci. This suggests that susceptibility to RVFV infection is controlled by many variants of modest effect.

We have previously shown that mouse embryonic fibroblasts derived from MBT mice lacked a complete type I interferon response, suggesting that inappropriate innate immune response could account for the susceptibility of MBT mice.²² A search for candidate genes using PosMed program²⁹ with 'innate immune response' as a keyword gave a list of 69, 105 and 180 genes for the critical interval as defined by C.MBT-*Rvfs1*, -*Rvfs2* and -*Rvfs3* congenic strains, respectively. This high number of candidate genes was expected given the large size of the critical regions, 16.9, 16.9 and 67.4 Mb, respectively. Therefore, the identification of the genes underlying the QTLs will first require the production

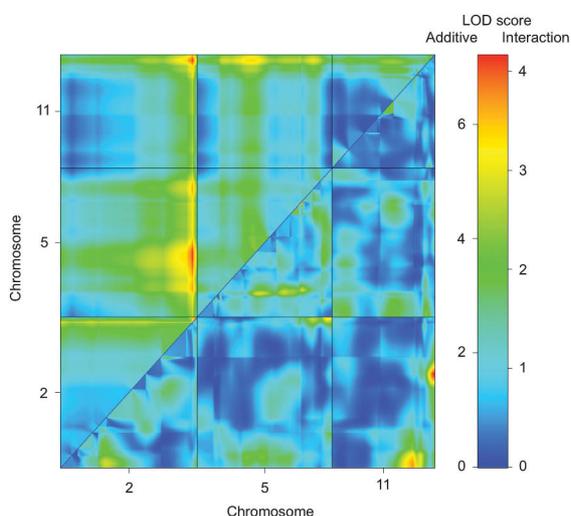


Figure 3. Close-up of two-dimensional genome scan on chromosomes 2, 5 and 11. The two-dimensional genome scan performed for the whole-genome revealed additive effects between loci on chromosomes 2, 5 and 11. A close-up of the two-dimensional scan on chromosomes 2, 5 and 11 is displayed with epistatic interaction in the lower right triangle, and additive effects in the upper left triangle. The color scale (right) indicates the additive LOD scores on the left and the interaction LOD scores on the right. The additive thresholds for significance levels 20% and 5% were calculated to be 5.25 and 6.15, respectively. The epistasis thresholds for the identification of novel interactions for significance levels 20% and 5% were 5.61 and 6.31, respectively. There is significant evidence in the upper left triangle for additive effects between loci on chromosomes 2 and 11, and between chromosomes 2 and 5, and suggestive evidence for additive effects between chromosomes 5 and 11. The results in the lower triangle indicate no significant evidence for epistatic interaction between chromosomes 2, 5 and 11.

Table 1. Analysis in a multiple QTL model with sex as a covariate

	Position (Mb)	Nearest marker	LOD	% variance explained	P-value	2-LOD support interval	Locus
Sex			12.8	10.10	2.41e-14		
Chr 2	168.2	rs27311433	4.2	3.17	7.32e-05	D2Mit306-rs3664044	<i>Rvfs1</i>
Chr 11	113.9	D11Mit214	3.8	2.88	0.00017	rs13481186-D11Mit69	<i>Rvfs2</i>
Chr 5	61.6	rs13478310	2.3	1.78	0.00452	D5Mit125-rs4225536	<i>Rvfs3</i>

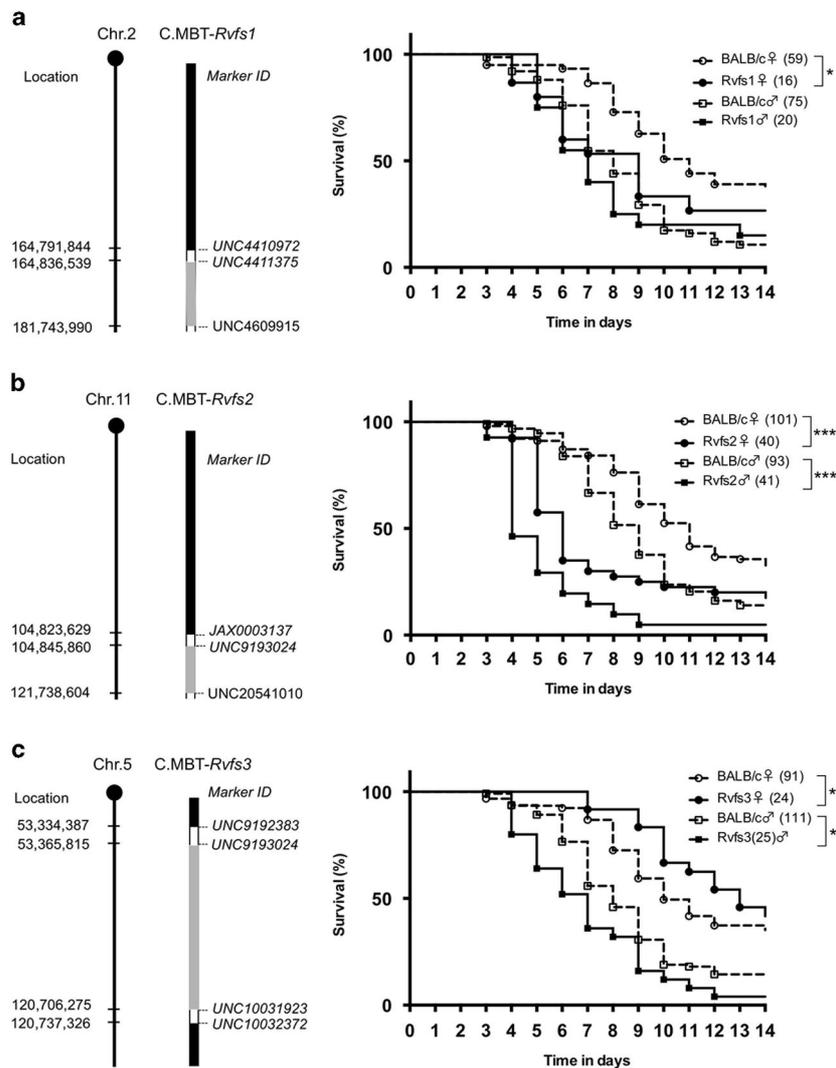


Figure 4. Schematic representation of the MBT genomic regions fixed in the congenic strains and the congenic strain survival curves. **(a)** Haplotype structure of the congenic segment of chromosome 2 in C.MBT-Rvfv1 (*Rvfv1*) congenic strain (left). The position of the MBT-derived chromosome 2 (grey) is shown on the BALB/c chromosome 2 background (black). Regions of unknown genotype are represented in white. Markers are identified along with their positions on the physical map (in bp). Kaplan-Meier survival plots of female and male *Rvfv1* mice (right). The number of animals per genotype and gender is given within brackets. **(b)** Haplotype of the congenic segment of chromosome 11 in C.MBT-Rvfv2 (*Rvfv2*) (left) and Kaplan-Meier survival plots of female and male *Rvfv2* mice (right). **(c)** Haplotype of the congenic segment of chromosome 5 in C.MBT-Rvfv3 (*Rvfv3*) mice (left) and Kaplan-Meier survival plots of female and male *Rvfv3* mice (right). (Log-rank test; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

of subcongenic strains for fine mapping to reach manageable numbers of candidate genes. Analysis of sequence variation between MBT and BALB/c genomes will also be performed. A drawback of using a wild-derived inbred strain is that the average divergence of approximately one SNP per 120 bp between *M. m. musculus* derived and laboratory genomes is higher than that observed between pairs of laboratory strains (one SNP per 700 bp).³⁰ This higher number of naturally occurring but functionally neutral polymorphic variants will complicate the identification of the causal mutation. Gene expression profiling in the target tissues of RVF disease from RVFV-infected C.MBT-Rvfv congenic and BALB/c control mice will also be of great utility. This combined effort will help narrow *Rvfv* QTLs to testable lists of candidate genes.

Although this study is the first of its kind in the mouse, detailed analyses of RVFV-infected inbred rats also demonstrated that the

host genotype determines the outcome of RVF disease. First evidence suggesting variation among rodent inbred lines came from Peters and co-workers¹⁷ who showed that Wistar-Furth inbred rats are highly susceptible to liver necrosis induced by subcutaneous infection with RVFV, whereas Lewis (LEW) rats are largely resistant. Resistance to hepatitis in LEW rats was shown to be inherited as a simple Mendelian dominant trait,²⁰ and derivation of a congenic line confirmed that a single chromosomal region was able to confer the resistance of LEW rats to the hepatic disease induced by infection with RVFV in susceptible Wistar-Furth rats.¹⁹ The locus involved has not been further defined or mapped and thus its relationship to the QTLs defined in our study is unknown. Altogether, experiments in rodent models of RVFV infection support the hypothesis that the differences in pathogenesis between breeds of ruminants,^{31–33} and among human

patients¹ are in part the result of genetic factors that influence susceptibility to RVFV infection.

Effect of sex in susceptibility to RVF disease in mice

A variety of other factors can potentially influence the severity of RVF disease, for example, the inoculation dose and virulence of the virus, the sex and the immune status of the host. We observed a significant sex effect in mice, not only in the BALB/c and MBT parental strains, but also in the F1 and F2 populations, with enhanced susceptibility in males compared with females. In fact, sex was the main factor explaining variance in the F2, higher than all three QTLs together (Table 1). RVFV infection in mice demonstrated tropism for a variety of organs, including the ovaries.²⁵ Consistent with this, the ovaries and uterus in females, the seminal vesicles, preputial glands, epididymis and testis in males were identified as a site of viral replication in mice infected with a recombinant RVFV expressing the *Renilla reniformis* luciferase.³⁴ In rats, males were reported to be somewhat more susceptible than females, and castrated males were more resistant than intact rats.²⁰ This suggests the implication of sex hormones on the regulation of genes that underlie resistance to RVF disease in rodents. This is in line with our finding that two of the three *Rvfv* QTLs have stronger effect in one of the sexes, in females for *Rvfv1*, and in males for *Rvfv3*.

In humans, reduced susceptibility to viral infections among females have been reported, presumably because females mount higher immune responses than males.³⁵ However, lower female mortality due to infectious diseases is not universal, and a reverse pattern of excess female mortality has been observed for measles and influenza.^{36,37} With regard to RVF disease, epidemiological studies in Saudi Arabia, Kenya, South Africa, Sudan and Gabon indicate that men are more frequently infected by RVFV than women.^{6,8,38–42} Direct contact with animal tissues, blood or other body fluids was reported to be the most common risk factor and route of transmission of RVFV to humans in South Africa and Kenya.^{38,39} Therefore, enhanced male morbidity in these regions of Africa may be explained by the occupation of herding, which implies slaughtering and milking, predominantly performed by men.⁴³ Infected men were also reported to be at higher risk than women to develop severe RVF disease and eventually die.^{38,43} Again, this may be the result of more frequent exposures to infected animals and their body fluids which provide opportunities for infection with large inocula of RVFV compared with the low number of infectious viral particles transmitted by bites from infected mosquitoes.⁴⁴ It is, however, not excluded that the higher fatality ratio measured in male human patients has also a biological basis as seen in rodents. Further clinical and epidemiological investigations in humans and genetic studies in rodents are needed to understand these sex and/or gender differences.

MATERIALS AND METHODS

Mice and crosses

BALB/cByJ (BALB/c) mice were purchased from Charles River Laboratories. The MBT/Pas (MBT) strain, derived from *M. m. musculus* progenitors trapped in Bulgaria in 1980,⁴⁵ is maintained at the Institut Pasteur. Female BALB/c mice were mated with male MBT mice to produce F1 hybrids. (BALB/c × MBT) F1 mice were intercrossed to produce F2 progeny ($n = 546$) for the genome scan. To develop congenic strains, female BALB/c mice were crossed with MBT male mice. F1 females were backcrossed to BALB/c males and the BC1 progeny were genotyped for several polymorphic microsatellite markers within the QTL regions on Chr 2, 5 or 11. Males that carried heterozygous alleles for one of the QTLs but not for the other two QTLs were selected as breeders for the next generation. By the fifth generation, all breeders were heterozygous for the MBT alleles in the targeted region but homozygous for the BALB/c alleles in the other two QTL chromosomal segments. After reaching the tenth generation, mice were intercrossed to obtain homozygous animals. All F2 and congenic

mice carried mitochondria and Y chromosome from BALB/c and MBT inbred strain, respectively. Experiments on live mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001) and the National Institutes of Health Animal Welfare (Insurance #A5476-01 issued on July 2, 2007). Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee #1 of the *Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale* (CREEA, Ile de France (N°2012-0025)), and carried out in compliance with Institut Pasteur Biosafety Committee.

Virus production and mouse infection

The RVFV strain ZH548, isolated from a male patient with the acute febrile illness at Zagazig fever hospital, Egypt (obtained from Centre National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales, Institut Pasteur, Lyon, France),^{46,47} was used for all infection studies. Virus was titrated by plaque assay on monolayers of Vero E6 cells.⁴⁸ Mice were bred under specific pathogen-free conditions and were transferred 1 week before infection into a BSL-3 isolator to allow acclimatization. Groups of 9–13-week-old animals were infected intraperitoneally with 100 PFU of RVFV strain ZH548. Morbidity, mortality and clinical disease scores were monitored daily for 14 days following infection. Animals that survived were killed on the last day of the monitoring period. Survival curves of congenic animals represent the pooled data from 4–12 experiments.

Genotyping and QTL mapping

Tail biopsies were collected at weaning from F2 progeny and high-quality DNA was prepared by standard phenol-chloroform extraction. Genotyping of F2 mice was performed using the GoldenGate platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). A total of 484 SNPs were genotyped. Out of them, 244 markers were polymorphic and gave reliable genotypes, covering the entire mouse genome. After the first analysis, 15 polymorphic microsatellite markers in the QTL regions were added to better define those regions. An interval mapping for the survival phenotype was performed with the R/qtl software (version 2.15.1) for mapping QTLs under a non-parametric model (death/survival) or under the two-part model (death/survival and survival time).^{23,27,49} Genome-wide thresholds for significance were determined by a 1000-permutation test. QTL were considered to be significant when the LOD scores exceeded the 5% genome-wide threshold and suggestive when the LOD scores exceeded the 20% genome-wide threshold. All significant and suggestive QTLs were assessed in a multiple-QTL model with sex as a covariate (formula = $y \sim \text{sex} + Q1 + Q2 + Q3$), using *makeqtl* and *fitqtl* functions in R/qtl, and the percentage of phenotypic variance was estimated. The 2-LOD units drop-off was used to estimate the 95% confidence interval of each QTL. Tail DNAs of congenic strains were collected and analyzed with the MegaMUGA genotyping microarray (Neogen/Geneseek, Lincoln, NE, USA), a new 78 000-probe array based on the Illumina Infinium platform.²⁴ Markers on the MegaMUGA are distributed genome-wide with an average spacing of 33 kb.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Survival curves were compared by log-rank test.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Rashida Lathan for reading the manuscript and editorial suggestions. We are grateful to all members of the laboratory for technical advice and helpful discussion. Genotyping of F2 mice was performed by the *Centre National de Génotypage* (Evry, France). This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (grant n° 11-BSV3-007 01, 'GenRift') and the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases (grant n° ANR-10-LABX-62-IBEID). The Mouse functional Genetics unit at the Institut Pasteur was funded by Merck-Serono. ST was awarded postdoctoral fellowships from the Pasteur Japan association, and the Region Ile-de-France (DIM Malinf 2010). We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) (representative: Emmanuelle Guillot-Combe) for a financial support to LB.

REFERENCES

- Ikegami T, Makino S. The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses* 2011; **3**: 493–519.
- Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res* 2010; **41**: 61.
- Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc* 2009; **234**: 883–893.
- Brown JL, Dominik JW, Morrissey RL. Respiratory infectivity of a recently isolated Egyptian strain of Rift Valley fever virus. *Infect Immun* 1981; **33**: 848–853.
- Chambers PG, Swanepoel R. Rift valley fever in abattoir workers. *Cent Afr J Med* 1980; **26**: 122–126.
- Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, Mishkhas AA, Al-Rabeah AM, Turkistani AM *et al*. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 1084–1092.
- Balkhy HH, Memish ZA. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **21**: 153–157.
- LaBeaud AD, Muchiri EM, Ndzovu M, Mwanje MT, Muiruri S, Peters CJ *et al*. Interepidemic Rift Valley fever virus seropositivity, northeastern Kenya. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 1240–1246.
- Sidwell RW, Smee DF. Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res* 2003; **57**: 101–111.
- Bouloy M, Weber F. Molecular biology of rift valley fever virus. *Open Virol J* 2010; **4**: 8–14.
- Ikegami T. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Res* 2012; **95**: 293–310.
- Vialat P, Billecocq A, Kohl A, Bouloy M. The S segment of rift valley fever phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *J Virol* 2000; **74**: 1538–1543.
- Bouloy M, Janzen C, Vialat P, Khun H, Pavlovic J, Huerre M *et al*. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol* 2001; **75**: 1371–1377.
- Habjan M, Pichlmair A, Elliott RM, Overby AK, Glatter T, Gstaiger M *et al*. NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 2009; **83**: 4365–4375.
- Ross TM, Bhardwaj N, Bissel SJ, Hartman AL, Smith DR. Animal models of Rift Valley fever virus infection. *Virus Res* 2012; **163**: 417–423.
- Anderson GW Jr., Slone TW Jr., Peters CJ. Pathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) in inbred rats. *Microb Pathog* 1987; **2**: 283–293.
- Peters CJ, Slone TW. Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection. *J Med Virol* 1982; **10**: 45–54.
- Ritter M, Bouloy M, Vialat P, Janzen C, Haller O, Frese M. Resistance to Rift Valley fever virus in *Rattus norvegicus*: genetic variability within certain 'inbred' strains. *J Gen Virol* 2000; **81**: 2683–2688.
- Anderson GW Jr., Rosebrock JA, Johnson AJ, Jennings GB, Peters CJ. Infection of inbred rat strains with Rift Valley fever virus: development of a congenic resistant strain and observations on age-dependence of resistance. *Am J Trop Med Hyg* 1991; **44**: 475–480.
- Peters CJ, Anderson J. Pathogenesis of Rift Valley Fever. *Contrib Epidemiol Biostat* 1981; **3**: 21–41.
- Schughart K, Libert C, Consortium S, Kas MJ. Controlling complexity: the clinical relevance of mouse complex genetics. *Eur J Hum Genet* 2013; **21**: 1191–1196.
- do Valle TZ, Billecocq A, Guillemot L, Alberts R, Gomet C, Geffers R *et al*. A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *J Immunol* 2010; **185**: 6146–6156.
- Broman KW. Mapping quantitative trait loci in the case of a spike in the phenotype distribution. *Genetics* 2003; **163**: 1169–1175.
- Rogala AR, Morgan AP, Christensen AM, Gooch TJ, Bell TA, Miller DR *et al*. The collaborative cross as a resource for modeling human disease: CC011/Unc, a new mouse model for spontaneous colitis. *Mamm Genome* 2014; **25**: 95–108.
- Smith DR, Steele KE, Shamblin J, Honko A, Johnson J, Reed C *et al*. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* 2010; **407**: 256–267.
- Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, Burnett S, Klenerman P, Cookson WO *et al*. Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice. *Nat Genet* 2006; **38**: 879–887.
- Roy MF, Riendeau N, Loredó-Osti JC, Malo D. Complexity in the host response to *Salmonella typhimurium* infection in AcB and BcA recombinant congenic strains. *Genes Immun* 2006; **7**: 655–666.
- Sebastiani G, Olien L, Gauthier S, Skamene E, Morgan K, Gros P *et al*. Mapping of genetic modulators of natural resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in wild-derived mice. *Genomics* 1998; **47**: 180–186.
- Makita Y, Kobayashi N, Yoshida Y, Doi K, Mochizuki Y, Nishikata K *et al*. PosMed: Ranking genes and bioresources based on Semantic Web Association Study. *Nucleic Acids Res* 2013; **41** (Web Server issue) W109–W114.
- Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, White MA, Wong K, Yalcin B *et al*. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 2011; **477**: 289–294.
- Swanepoel R, Struthers JK, Erasmus MJ, Shepherd SP, McGillivray GM, Shepherd AJ *et al*. Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other African phleboviruses in sheep. *J Hyg (Lond)* 1986; **97**: 331–346.
- Olaleye OD, Tomori O, Fajimi JL, Schmitz H. Experimental infection of three Nigerian breeds of sheep with the Zinga strain of the Rift Valley Fever virus. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 1996; **49**: 6–16.
- Busquets N, Xavier F, Martin-Folgar R, Lorenzo G, Galindo-Cardiel I, del Val BP *et al*. Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; **10**: 689–696.
- Gomet C, Billecocq A, Jouvion G, Hasan M, Zaverucha do Valle T, Guillemot L *et al*. Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**: e1421.
- Klein SL, Huber S. Sex differences in susceptibility to viral infection. In: Klein SL, Roberts CW. (eds) *Sex Hormones and Immunity to Infection*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2010, pp 93–122.
- Garenne M. Sex differences in measles mortality: a world review. *Int J Epidemiol* 1994; **23**: 632–642.
- Klein SL, Hodgson A, Robinson DP. Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2012; **92**: 67–73.
- Anyangu AS, Gould LH, Sharif SK, Nguku PM, Omolo JO, Mutonga D *et al*. Risk factors for severe Rift Valley fever infection in Kenya, 2007. *Am J Trop Med Hyg* 2010; **83**: 14–21.
- Archer BN, Thomas J, Weyer J, Cengimbo A, Landoh DE, Jacobs C *et al*. Epidemiologic investigations into outbreaks of rift valley Fever in humans, South Africa, 2008–2011. *Emerg Infect Dis* 2013; **19**: 1918–1925.
- Hassanain AM, Noureldien W, Karsany MS, Saeed el NS, Aradaib IE, Adam I. Rift Valley Fever among febrile patients at New Halfa hospital, eastern Sudan. *Virol J* 2010; **7**: 97.
- LaBeaud AD, Muiruri S, Sutherland LJ, Dahir S, Gildengorin G, Morrill J *et al*. Postepidemic analysis of Rift Valley fever virus transmission in northeastern Kenya: a village cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; **5**: e1265.
- Pourrut X, Nkoghe D, Souris M, Paupy C, Paweska J, Padilla C *et al*. Rift Valley fever virus seroprevalence in human rural populations of Gabon. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; **4**: e763.
- Nguku PM, Sharif SK, Mutonga D, Amwayi S, Omolo J, Mohammed O *et al*. An investigation of a major outbreak of Rift Valley fever in Kenya: 2006–2007. *Am J Trop Med Hyg* 2010; **83**: 5–13.
- Amraoui F, Krida G, Bouattour A, Rhim A, Daaboub J, Harrat Z *et al*. *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley fever viruses in the Maghreb region. *PLoS ONE* 2012; **7**: e36757.
- Orth A, Lyapunova E, Kandaurov A, Boissinot S, Boursot P, Vorontsov N *et al*. [Polyploid species *Mus musculus* in Transcaucasia]. *C R Acad Sci III* 1996; **319**: 435–441.
- El-Akkad AM. Rift Valley fever outbreak in Egypt. October–December 1977. *J Egypt. Public Health Assoc* 1978; **53**: 123–128.
- Meegan JM. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977–78. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979; **73**: 618–623.
- Billecocq A, Gauliard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, Bouloy M. RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology* 2008; **378**: 377–384.
- Broman KW, Sen S. *A guide to QTL mapping with R/qtl*. Springer: Dordrecht, 2009.

« [Hermès :] *Mais alors le chien ailé de Zeus, l'aigle sanglant, déchirera voracement de vastes lambeaux de ton corps [de Prométhée], convive qui, sans être invité, viendra se repaître tout le long du jour du noir régal de ton foie* »²¹

LA CARACTÉRISATION DE LA PATHOGENÈSE DE LA FVR

Puisque l'intervalle *Rvfs2* induit une sensibilité précoce chez les souris, rappelant le phénotype de la lignée parentale MBT, et comprend le plus petit nombre de gènes (environ 600 gènes), nous avons décidé d'étudier d'abord les facteurs génétiques de sensibilité qui y sont présents.

Les gènes localisés dans une région critique et impliqués dans la réponse d'un organisme à une infection ne sont pas faciles à identifier même lorsque qu'ils sont en petit nombre. Le VFVR infecte de nombreux types cellulaires chez les Mammifères, les protéines virales interagissent avec plusieurs voies de signalisation, et mettent en jeu de nombreux mécanismes de défense à l'intérieur de la cellule et dans tout l'organisme. Pour cette raison, le gène recherché peut avoir des fonctions très diverses.

C'est ainsi que nous sommes parvenus à étudier la progression de la pathogenèse de la maladie précoce chez les souris congéniques C.MBT-*Rvfs2* et à la comparer à celle des souris BALB/c. L'article présenté ci-après décrit ce travail.

1 Résultats Principaux

1.1 L'état général de santé

Nous avons commencé par une évaluation des paramètres indicateurs de l'état général de santé des souris. Le poids et la température sont des paramètres utilisés d'ordinaire pour l'étude des infections. À ceux-ci, nous avons ajouté le niveau de transaminases dans le sérum – ALT et AST – qui indique l'état lésionnel du foie, l'organe le plus atteint lors de la phase précoce de la maladie chez les Mammifères. Malgré les signes de souffrance hépatique à

²¹ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 1009-1062

partir du 3^{ème} jour après l'infection, aucune différence n'a été observée entre les souris congéniques et BALB/c pour les trois paramètres.

1.2 La charge virale

Ensuite, nous avons étudié la cinétique de l'infection par la quantification de la charge virale dans le sang et dans le foie. Alors que les niveaux d'ARN viraux dans le sang ont augmenté de façon exponentielle entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour après l'infection et que la charge virale dans le foie au 3^{ème} jour était très élevée, les mêmes ordres de magnitude ont été observés chez les souris C.MBT-*Rvfs2* et BALB/c.

Collectivement, les résultats indiquent une dissémination virale et une progression initiale de la maladie similaires dans les deux lignées.

1.3 L'étude anatomo-pathologique

Pour tester si la différence de sensibilité entre les deux lignées peut être expliquée par l'Histologie, nous avons réalisé une analyse anatomo-pathologique du foie au 3^{ème} jour après l'infection. Trois profils lésionnels ont été observés dans les deux génotypes, C.MBT-*Rvfs2* et BALB/c. Les profils sont variables entre une infection modérée accompagnée de plusieurs foyers d'inflammation, et une hépatite nécrosante massive sans évidence d'inflammation. Les profils sont également distribués entre les deux génotypes.

Par ces observations, nous avons montré que la maladie provoquée par la FVR est une maladie complexe, présentant différents degrés de sévérité sur une population de souris génétiquement identiques.

Puisque la maladie précoce semble identique au niveau histologique, nous avons analysé le tissu hépatique et le cerveau des deux groupes génotypiques à un stade terminal. Alors que les souris C.MBT-*Rvfs2* présentaient toutes des hépatites très sévères qui ont probablement conduit à la mort des souris, les souris BALB/c ne présentaient plus de trace de l'infection, et le tissu hépatique était normal. En revanche, les souris BALB/c présentaient une infection sévère de différentes structures du système nerveux central.

Enfin, nous nous sommes demandé si la régénération hépatique observée chez les souris BALB/c était issue d'une prolifération importante des cellules hépatiques qui auraient remplacé le tissu nécrosé. Le marquage du parenchyme hépatique des souris BALB/c par l'antigène spécifique de la mitose Ki67 a mis en évidence une prolifération importante des hépatocytes dans le foie des souris au 4^{ème} jour après l'infection.

Genetic dissection of Rift Valley fever pathogenesis:

***Rfvs2* on mouse chromosome 11 impacts tolerance to early onset hepatitis**

Leandro Batista,^{1,2,3} Gregory Jouvion,⁴ Dominique Simon,^{1,2} Satoko Tokuda,^{1,2} Tania Zaverucha Do Valle,^{1,2,5} Michèle Bouloy,⁶ Marie Flamand,⁷ Xavier Montagutelli,^{1,2}, Jean-Jacques Panthier^{1,2}

¹ Institut Pasteur, Département de Biologie du Développement & Cellules Souches, Génétique fonctionnelle de la Souris, F-75015, Paris, France

² Centre National de la Recherche Scientifique, URA 2578, F-75015 Paris, France

³ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IFD, F-75006 Paris, France

⁴ Institut Pasteur, Histopathologie humaine et modèles animaux, F-75015, Paris, France,

⁵ Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. FIOCRUZ - RJ, Brasil

⁶ Institut Pasteur, Génétique moléculaire des Bunyavirus, F-75015 Paris, France,

⁷ Institut Pasteur, Virologie Structurale, F-75015 Paris, France.

RUNNING TITLE: *Rfvs2* triggers tolerance to hepatitis

KEY WORDS: Bunyavirus; Hepatitis; Mouse model; Tolerance; Complex traits; Infectious diseases; Virus; Liver Regeneration; Congenic strain; Emerging disease

CORRESPONDENCE: Jean-Jacques Panthier, phone number 33 1 45 68 85 55; fax number 33 1 45 68 86 34; jean-jacques.panthier@pasteur.fr

Abstract

The systemic inoculation of mice with Rift Valley fever virus (RVFV) reproduces major pathological features of severe human disease, notably the rapid onset hepatitis and delayed onset encephalitis. Our genetic studies on the MBT inbred mouse strain have identified a genetic interval on chromosome 11 (*Rvfs-2*) linked to susceptibility to infection with RVFV. This study investigates the mechanisms by which *Rvfs-2* confers increased susceptibility to BALB/c mice that are congenic for *Rvfs-2* (C.MBT-*Rvfs2*) after infection with the virulent strain ZH548. On the BALB/c genetic background, *Rvfs-2* by itself is sufficient to reduce the survival time of RVFV-infected mice of both sexes. Detailed studies showed that *Rvfs-2* has no effect on clinical parameters and RNA viral loads in the peripheral blood and liver. In addition, C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice exhibit similar liver damage between days 3 and 5 post infection. However, C.MBT-*Rvfs2* mice die at that point with hepatitis, whereas BALB/c mice recover from this condition. This indicates that *Rvfs2* impacts the host tolerance to the acute early-onset hepatitis. Moreover, an increased hepatocyte proliferation in BALB/c livers accounts for their full recovery from hepatitis and the tolerance phenotype. We propose that *Rvfs2* affects the regenerative capacity of the liver tissue in response to RVFV infection.

Introduction

Rift Valley fever (RVF) is a mosquito-borne viral disease with severe impact on human and animal health. In humans, infection may lead to a great variety of clinical manifestations that range from a febrile influenza-like illness to retinitis, hepatitis with fatal hemorrhagic fever and encephalitis [1,2]. In livestock species, a wide variation in susceptibility to RVF disease is observed in different ruminant breeds, ranging from unapparent or moderate febrile reactions to high fevers, severe prostration, and death in the most susceptible animals [3-5]. It therefore seemed that RVF is a complex disease in which the host/virus interaction is heavily influenced by host genetic factors. Rodent models have helped to establish genetic host factors as a key element in RVF disease severity. Infection of laboratory rodents mimics several features of RVFV-induced pathology in humans, including hepatic necrosis and meningoencephalitis [6,7]. The first rat model consisted of the Wistar-Furth (WF) inbred strain which is highly susceptible to the hepatitis induced by subcutaneous inoculation with ZH501 Egyptian strain of RVFV, while the Lewis (LEW) strain is largely resistant [8]. Segregation analysis of the RVFV susceptible phenotype in LEW and WF backcrosses suggested a simple Mendelian dominant control [9]. A locus able to confer resistance to the fatal hepatitis had been transferred by repeated backcrosses from the resistant LEW to the WF susceptible genetic background, indicating that a single locus is indeed able to contribute in a significant manner to resistance to the fatal liver disease [10]. More recently, the effect of inhalation exposure to RVFV was evaluated in rat inbred strains. After respiratory infection with RVFV, WF rats rapidly developed fatal hepatitis whereas LEW developed encephalitis at later times [11], thus confirming the exquisite susceptibility of the WF strain to RVFV-induced hepatitis. Mouse inbred strains also exhibit differences to infection with RVFV. Subcutaneous infection of BALB/c mice with 10^3 PFU of RVFV strain ZH501 led to an overwhelming infection of the liver responsible for the death of most animals between days 3 and 6 post infection, while the remaining mice developed encephalitis and died around day 8 post infection [7]. C57BL/6 mice appear more susceptible than BALB/c mice in these experimental conditions. They all succumbed to acute hepatitis within 4 days [12]. We have tested the susceptibility of strains derived from various *Mus* subspecies trapped in the wild. This collection of wild-derived inbred strains encompasses genetic variation accumulated over the past million years, offering a greater genetic variation than that found in classical laboratory strains [13]. The most severely affected strain within this collection, MBT/Pas (MBT), developed very early onset RVF disease in both sexes. After intraperitoneal infection

with 10^2 PFU virulent RVFV strain, either Egyptian ZH548 or Kenya 98, MBT mice died sooner than BALB/c or C57BL/6 mice treated in parallel [14]. MBT mice also exhibited earlier and greater viremia than BALB/c mice. Following infection with RVFV, the production of infectious particles was also higher in MBT mouse embryonic fibroblasts (MEFs) than in BALB/c MEFs. Furthermore, RVFV-infected MBT MEFs exhibited a noticeably lower IFN-dependent response compared with BALB/c MEFs, suggesting that MBT mice have a defect in their IFN response to RVFV infection [14]. To determine the number and location of genes contributing to RVF susceptibility in MBT mice, we have performed segregation studies which have shown that RVF susceptibility is inherited in a complex polygenic fashion in mice. Three genomic intervals on chromosomes (Chr) 2, 5 and 11 that contain RVF-susceptibility loci were identified via analysis of a F2 cross with BALB/c. Each of these MBT-derived intervals, designated *Rvfs-1*, *Rvfs-2* and *Rvfs-3*, conferred reduced survival time when transferred onto the resistant BALB/c genetic background [15]. The genes and pathogenic mechanisms that trigger the susceptibility of MBT mice to RVF disease remain unknown. To elucidate the mechanisms by which *Rvfs-2* confers susceptibility to RVF disease in mice of both sexes and to prioritize candidate genes within the interval, we investigated the *in vivo* phenotype of C.MBT-*Rvfs2* mice, which are BALB/c mice rendered congenic for the MBT derived *Rvfs-2* interval, after the infection with RVFV ZH548. The quantitative clinical traits, biochemical parameters, virological variables, and histopathological analyses of the RVF disease showed that mice from both BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* inbred strains exhibited hepatitis, the first clinical signs of which were detected at day 3 post infection in both strains. However, whereas C.MBT-*Rvfs2* mice died the next day from acute hepatitis, BALB/c mice recovered from the hepatitis, and died 4 days later from encephalitis. We believe that the primer role of *Rvfs-2* is to delay the regeneration of liver in RVFV-infected congenic mice. Since *Rvfs-2* had no impact on the reduction of pathogen burden, we propose that the failure of C.MBT-*Rvfs2* mice is due to impaired tolerance to the acute hepatitis associated with an RVFV infection.

Methods

Ethics statement

Experiments on live mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001) and the National Institutes of Health Animal Welfare (Insurance #A5476-01 issued on July 2, 2007). Experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee #1 of the Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale (CREEA), Ile de France (N°2012-0025), and carried out in compliance with Institut Pasteur Biosafety Committee.

Mice

BALB/cByJ (BALB/c) and C.MBT-Rvfs2 mice are maintained at the Institut Pasteur.

Virus production and mouse infection

The RVFV strain ZH548, isolated from a male patient with the acute febrile illness at Zagazig fever hospital, Egypt [16,17] (obtained from Centre National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales, Institut Pasteur, Lyon, France), was used for all infection studies. Virus was titrated by plaque assay on monolayers of Vero E6 cells [18]. Mice were bred under specific pathogen free conditions and were transferred one week before infection into a BSL-3 isolator to allow acclimatization. Groups of 9- to 13-week-old animals were infected intraperitoneally with 100 PFU of RVFV strain ZH548. Morbidity, mortality and clinical disease scores were monitored daily for 14 days following infection. Animals that survived were euthanized on the last day of the monitoring period.

Clinical evaluation

IPTT-300 programmable temperature transponders (PLEXX) were implanted subcutaneously a week prior to challenge in BALB/c (N=9) and C.MBT-Rvfs2 (N=9) male mice to measure daily body temperature. Body weight of ZH548-infected BALB/c (N=26) and C.MBT-Rvfs2 (N=12) mice was measured daily throughout the course of the experiment, and the daily weight loss calculated. Clinical chemistry analysis was performed using IDEXX diagnostic panels analyzed on a VetTest chemistry analyzer (IDEXX laboratories) on ZH548-infected BALB/c (N=30) and C.MBT-Rvfs2 (N=22) male mice.

Viral RNA load in Blood and Liver

BALB/c (N=49) and C.MBT-*Rvfs2* (N=30) male mice were infected with the RVFV ZH548 strain. Five microliters of blood were harvested from the tail and collected daily until mice became moribund and were euthanized. Caudate lobes of liver were collected on day 3 post infection from euthanized BALB/c (N=9) and C.MBT-*Rvfs2* (N=8) mice. Blood and liver samples were stored in Trizol LS reagent (Invitrogen) at -80°C until they were used for the RNA extraction. RVFV RNA was quantitated by real-time fluorogenic reverse transcription (RT)-PCR using the following primers and probe to the N gene of RVFV: forward primer 5'-CTTGGCATCCTTCTCCCAG-3', reverse primer 5'-CAAGCAGTGGACCGCAAT-3', and probe 5'-TTGAACAGTGGGTCCGAGAGTTTG-3) labeled at the 5' and 3' end with the reporter dye FAM and the quencher TAM, respectively. To normalize RNA samples, a calibration curve was generated by plotting the Ct values against the logarithm of the copy numbers of serial ten fold dilutions ranging from 10⁶ to 10² copies of RVFV ZH548 RNA (expressed in PFU).

Histopathology

Groups of RVFV-infected BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* male mice were monitored for the development of RVF disease. Mice were euthanized at three different times along the 14-day period of observation. Randomly selected RVFV-infected BALB/c (N=10) and C.MBT-*Rvfs2* (N=8) mice were euthanized at an early stage (day 3 post infection). Infected BALB/c mice (N=4) and C.MBT-*Rvfs2* mice (N=5) were euthanized upon the development of severe signs of clinical illness and moribundity, on days 7-9 post infection and on days 3-4.5 post infection, respectively. BALB/c mice (N=5) that survived until day 14 post infection of the monitoring period were also euthanized. The liver and brain were removed and immediately fixed for one week in 10% neutral-buffered formalin. Samples from each organ were embedded in paraffin; 4 mm-thick sections were cut and stained with hematoxylin and eosin (HE). We also carried out an immunohistochemical detection of the RVFV using mouse antibodies against the N nucleocapsid protein of RVFV (dilution 1:100), and of Ki67 antigen, using a rabbit monoclonal antibody (Ref: AB16667, dilution 1:50; ABCAM). Visualization was performed with the Histofine Simple Stain MAX-PO kit (Histofine Biosciences Inc.). Sections were analyzed in a blind study on coded slides.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad). Survival curves were compared by log-rank test.

Results

BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice suffer from liver disease at the early stage of infection

Challenge of C.MBT-*Rvfs2* congenic mice with 100 PFU of the ZH548 RVFV strain showed that *Rvfs2* has strong effect on susceptibility. More than 50% of C.MBT-*Rvfs2* mice died within 4 days after infection with RVFV, whereas half of their BALB/c counterparts survived longer than 9 days (log-rank test, $P < 0.0001$) (Figure 1). To explore the causes of this increased susceptibility, clinical signs of disease in RVFV-infected BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice were monitored daily. Most RVFV-infected BALB/c mice exhibited the first symptoms of disease from day 6 post infection, with different degrees of disorders ranging from ascending paralysis, ataxia, head-tilt and circling behavior. In contrast, C.MBT-*Rvfs2* mice developed as early as days 3 and 4 post infection, signs of an acute disease with ruffled fur, hunched appearance and lethargy. These clinical observations suggested different manifestations of the disease in both inbred strains. To further characterize differences in disease progression between C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice, quantitative clinical traits and biochemical parameters associated with the health status were recorded. Both body weight and body temperature were measured daily in RVFV-infected mice from both strains. BALB/c mice lost weight on days 3 and 4 post infection, and also later from day 7 to day 10 post infection. Between these two intervals their body weight remained unchanged. C.MBT-*Rvfs2* mice lost weight rapidly from day 3 post infection until time of death (Fig. 2A). No differences were found in the weight loss at days 3 and 4 between the two strains (two-way ANOVA, $P = 0.54$). Temperature measurements indicated that neither BALB/c nor C.MBT-*Rvfs2* mice became febrile during the course of infection. A significant drop in body temperature was observed one day before death in both inbred strains (Fig. 2B). Overall, no differences were found in body temperature between BALB/c and congenic mice (two-way ANOVA, $P = 0.69$). As RVFV is known to be a hepatotropic virus [19], blood levels of liver enzymes were measured during the disease course in uninfected and infected BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) peaked on day 4 post infection for both infected BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice (Fig. 2C and D), indicating extensive liver damage. After day 5 post infection, the serum level of liver enzymes decreased over time in infected BALB/c mice. Normal transaminase level was retrieved in the serum of BALB/c mice on day 8 post infection, suggesting a full recovery from liver disease. Altogether the onset and initial development of the RVF disease were comparable in both inbred strains.

RNA viral load increases similarly in both groups after infection

In order to assess differences in the viral spread and production between BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice, blood samples were collected daily from the tail of infected mice and the viral RNA quantified. Viral RNAs were first detected on day 2 post infection in 18% of BALB/c mice. On days 3 and 4 post infection, viral RNAs were detected in 92% and 97% of BALB/c mice, respectively. The same results were observed in C.MBT-*Rvfs2* mice, suggesting that the viral spread was equivalent in both strains. The viral RNA load in BALB/c mice increased exponentially after the first detection and individual viral loads peaked at day 4 post infection (Fig. 3A). C.MBT-*Rvfs2* mice displayed a similar increase and no significant differences were observed between the two curves (two-way ANOVA, $P=0.17$). These results indicated that susceptibility difference is not related to higher viral production in C.MBT-*Rvfs2* compared to BALB/c mice. The viral RNA load in BALB/c blood started decreasing gradually from day 5 post infection, and viral clearance was observed in the blood of 67% of BALB/c mice that survived the 14-day period (not depicted). We further measured the viral RNA load in the liver of BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* on day 3 post infection (Fig. 3B). No differences were found in viral RNA load in the liver of both strains (Mann-Whitney test, $P=0.94$).

Altogether these results indicate that C.MBT-*Rvfs2* mice, just as BALB/c mice, are unable to stop the spread and the production of the virus systematically and specifically in the liver at an early stage after infection.

BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice exhibit similar liver damage at days 3 and 4 post infection

We studied in further detail the tissue damage caused by RVFV in the liver of infected BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice. Randomly selected RVFV-infected BALB/c ($N=10$) and C.MBT-*Rvfs2* ($N=8$) mice were euthanized on day 3 post infection. Histopathological analysis of the liver revealed three different lesion profiles with increased severity and unrelated to mouse genotype (Fig. 4). Five BALB/c and five C.MBT-*Rvfs2* mice exhibited mild, multifocal, well demarcated lesions (Profile 1), characterized by hepatocyte necrosis/apoptosis associated with small infiltrates of inflammatory cells containing fragmented neutrophils. Immunohistochemical analysis directed against the viral N protein revealed small multifocal foci (less than 100 μm in diameter) of infected hepatocytes. Three BALB/c and two C.MBT-*Rvfs2* mice presented Profile 2. This profile was also characterized by multifocal lesions with hepatocyte necrosis/apoptosis. However, lesions were more severe,

extensive and diffuse. A stronger signal was detected in IHC, with slightly larger foci of infected hepatocytes. A third profile was observed in two BALB/c and one C.MBT-*Rvfs2* mice. Liver sections labeled as Profile 3 displayed severe and diffuse lesions, characterized by acute and massive apoptosis/necrosis of hepatocytes, presence of numerous viral inclusion bodies in the nuclei of surviving hepatocytes, absence of inflammation and a diffuse positive immunolabeling of hepatocytes for the viral N protein. Collectively, these results indicate that BALB/c and C.MBT-*Rvfs2* mice experienced similar liver conditions on day 3 post infection. In both strains, the hepatitis appeared to progress from mild lesions to severe and extensive destruction of the liver parenchyma.

In order to provide further evidence of the progression, we examined the liver of moribund C.MBT-*Rvfs2* mice. Five congenic mice that exhibited clinical signs of severe disease were euthanized on days 3 (N=1), 4 (N=2) and 4.5 (N=2) post infection, respectively. All five livers displayed severe lesions with massive acute apoptosis/necrosis and no inflammation, similar to those described in Profile 3 (not depicted), supporting the hypothesis that, in C.MBT-*Rvfs2* mice, the hepatitis progressed from mild inflammation to non-inflammatory hepatitis with extensive tissue damage. The lesions observed in the liver of moribund C.MBT-*Rvfs2* were sufficient to alter liver function, leading to rapid death of infected animals.

Infected BALB/c mice survive the early onset hepatitis and succumb later to encephalitis

The liver enzymes and histopathological examination indicated that both inbred strains developed acute hepatitis readily detected on days 3 and 4 post infection. Later, the level of liver enzymes decreased in BALB/c mice to normal levels at day 8 post infection, suggesting liver regeneration between days 5 and 8 post infection. To evaluate the extent of liver recovery, moribund BALB/c mice (N=4) were euthanized between day 6 and 9 post-infection, and their livers examined for histopathological changes (Fig. 5 and 6). On day 6 post infection, only minimal lesions and signs of infection (anti-N IHC) were detected, but an increased number of mitosis, associated with a strong and diffuse expression of Ki67 confirmed diffuse proliferation of hepatocytes. Hepatocyte proliferation is very likely responsible for the liver regeneration (Fig. 5). By day 9, minimal to mild, subacute to chronic inflammatory lesions were observed, consisting of small infiltrates of lymphocytes, plasma cells and macrophages, randomly distributed in the liver parenchyma or centered on portal tracts. Very few hepatocytes were labeled positively for the viral N protein, confirming an efficient viral clearance in hepatic tissue (Fig. 6 A-C). Since BALB/c mice exhibited clinical neurological signs, we investigated their brain for infection-related lesions. Histopathological

lesions were evident in the brain of moribund BALB/c mice. The virus targeted different brain anatomic structures in each individual mouse, and no pathognomonic lesion profile could be defined (Fig. 6 D-I). We detected (i) subacute leptomeningitis with multifocal infiltration of leptomeninges by lymphocytes, plasma cells, and neutrophils, and (ii) necrotic/apoptotic foci in different locations of the cerebral grey matter, e.g. the outer granular layer or different brain nuclei. In these foci, shrinkage of neurons, activation of microglial cells, infiltration of neutrophils and strong immunolabeling of neurons were observed. These lesions were very likely the cause of lethality in BALB/c mice.

Discussion

There is considerable variability in the ability of patients and livestock to survive RVF disease. Naturally, a number of factors may contribute to either life or death, a complex phenotype that involves multiple systems, organs, tissues, cellular pathways, and genes. The inoculation route and dose, the age, and the sex of the host have been shown to be important parameters of RVF disease severity in laboratory rodents [9-11,14,20]. Experiments in rodents have further demonstrated that survival time and survival rate following RVFV infection has a host genetic component [8,14]. We have previously shown that susceptibility to RVF in inbred MBT mouse strain is inherited in a complex fashion, with sex influencing the severity of the disease. Three RVF susceptibility loci (*Rvfs*) with moderate effect on the survival time, accounting each for 1.7 to 3.1 % of the total variance of an individual's phenotype, were identified. Such effects may seem too small to be tractable. However the introgression by repeated backcrosses of each of these chromosomal regions within the resistant genetic background (BALB/c) led to congenic mice exhibiting significant reduction in survival time compared to the control series [15]. These genetic analyses have not provided definitive information on the role of *Rvfs* loci in the etiology of RVF. We chose to focus our efforts first on *Rvfs2* because of its effect in both females and males. Although C.MBT-*Rvfs2* mice were more susceptible to RVF than BALB/c mice, they were less susceptible than MBT mice; with a few exceptions all MBT males died within 4 days post infection, whereas $\approx 40\%$ of C.MBT-*Rvfs2* males survived for a longer period. These findings provide evidence that *Rvfs2* contributes, but only in part, to the susceptibility of MBT mice. On the same vein, our data show that the virus spread and production were similar in C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice. In particular, C.MBT-*Rvfs2* mice did not develop earlier and higher viral RNA loads in blood than BALB/c mice. This is in contrast with MBT mice whose blood contained higher

levels of RVFV by day 1 post infection. These data suggest that *Rvfs2* does not contribute a phenotype that limits virus replication and production. In our mouse model, the animals were infected intraperitoneally with 10^2 PFU of the Egyptian ZH548 RVFV strain [1,17]. These infection procedures were chosen initially to maximize the difference between the mean survival time of the susceptible (MBT) and resistant (BALB/c) strains [14]. In these conditions, all MBT males died with the clinical signs of hepatitis, and none of these mice exhibited signs of encephalitis, such as paralysis, ataxia, or head-tilting behavior. The pathogenesis induced by subcutaneous challenge of BALB/c females with 10^3 PFU ZH501 RVFV was more recently characterized in detail [7,21]. Both ZH548 and ZH501 RVFV strains have been isolated at the Zagazig fever hospital during the 1977 Egyptian outbreak, and they exhibit differences at the nucleotide level of only 0.33% [17,22,23]. The manifestations of the disease were more severe with higher inoculation dose than in our standard conditions, in lines with the pioneering experiments by Cedric Mims [20]. Indeed, $\approx 80\%$ of BALB/c females infected with 10^3 PFU of RVFV succumbed between days 3 and 6 post infection with severe hepatitis while the remaining mice died later with encephalitis [7]. Despite the differences in inoculation dose and route, and viral strains, our findings are consistent with the biphasic RVF disease in BALB/c mice characterized by Smith and colleagues that consists of an acute hepatitis followed by a panencephalitis [7]. Following that reasoning, C.MBT-*Rvfs2* mice appear as highly susceptible to the early-onset hepatitis, while BALB/c mice die later with encephalitis. Altogether, these findings establish the feasibility of detecting important sub-phenotypes by transferring *Rvfs* locus from the susceptible to the resistant background.

Interestingly, a similar susceptibility to acute hepatitis has been reported in WF inbred rats after subcutaneous infection with 5×10^5 PFU ZH501 RVFV [6]. WF rats all died by day 2 post inoculation with liver necrosis, whereas LEW rats were resistant to the liver disease but fairly susceptible to the encephalitis [6,10]. This susceptibility to hepatitis occurred in a similar time frame after respiratory infection in WF rats [11]. The susceptibility of WF strain to the subcutaneous challenge could be rescued by a single chromosomal region from resistant LEW inbred strain [10]. The locus involved has not been further defined or mapped and thus its relationship to *Rvfs2* is unknown. However the comparison of the pathogenesis in WF and C.MBT-*Rvfs2* strains suggests that the rat and mouse susceptibility loci are not concordant. Susceptible WF rats had blood viral titers approximately four order of magnitude greater than resistant LEW rats at day 2 post infection [10]. This is in line with the higher viral production in hepatocytes from WF rats compared with LEW rats [24]. These data

suggest that the rat susceptibility locus is involved in controlling spread and production of RVFV. By contrast, as mentioned above *Rvfs2* has no effect of RVFV spread and production. In principle, the RVFV infected host can protect itself from lethal liver disease using two strategies: (i) resistance to reduce viral burden, (ii) tolerance to reduce the negative impact of infection on host fitness [25,26]. Our data indicate that the early death of C.MBT-*Rvfs2* mice cannot be attributed to higher levels of RVFV in the liver tissue. These results suggest that the lethal outcome in C.MBT-*Rvfs2* mice was not due to impaired resistance. Despite the dramatic difference in host survival, histological analyses and clinical chemistry, while providing a clear indication for severe liver disease, revealed similar degrees of liver tissue damage in C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice. Liver of C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice exhibited similar weak inflammatory response during the acute phase of hepatitis at days 3 and 4 post infection. However, the drop in liver enzymes at day 5 post infection, and the full liver recovery at days 7 to 9 post infection in BALB/c mice suggested that a liver repair mechanism was responsible for the tolerance of these mice to infection. Immunolabeling results for Ki67 further indicated that tolerance to infection is related to an increased hepatocyte proliferation. This is seemingly the mechanism allowing liver tissue repair. We propose that susceptibility to lethal liver disease in C.MBT-*Rvfs2* strain is due to an impaired ability to regenerate hepatic tissue and thus tolerate liver damage following RVFV-induced liver injury.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Rashida Lathan for reading the manuscript and editorial suggestions. We are grateful to all members of the laboratory for technical advice and helpful discussion. Genotyping of F2 mice was performed by the *Centre National de Génotypage* (Evry, France). This work was supported by the *Agence Nationale de la Recherche* (grant n° 11-BSV3-007 01, 'GenRift') and the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases (grant n° ANR-10-LABX-62-IBEID). The Mouse functional Genetics unit at the Institut Pasteur was funded by Merck-Serono. ST was awarded postdoctoral fellowships from the Pasteur Japan association, and the Region Ile-de-France (DIM Malinf 2010). We thank Direction Générale de l'Armement (DGA) (representative: Emmanuelle Guillot-Combe) for a financial support to LB.

References

1. Ikegami T, Makino S (2011) The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses* 3: 493-519.
2. Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J (2010) Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res* 41: 61.
3. Busquets N, Xavier F, Martin-Folgar R, Lorenzo G, Galindo-Cardiel I, et al. (2010) Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 689-696.
4. Davies FG, Martin, V. (2003) Recognizing Rift Valley Fever. *FAO Animal Health Manual*. Rome: Food and agricultural organization of the United Nations. pp. 1- 45.
5. Olaleye OD, Tomori O, Fajimi JL, Schmitz H (1996) Experimental infection of three Nigerian breeds of sheep with the Zinga strain of the Rift Valley Fever virus. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 49: 6-16.
6. Anderson GW, Jr., Slone TW, Jr., Peters CJ (1987) Pathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) in inbred rats. *Microb Pathog* 2: 283-293.
7. Smith DR, Steele KE, Shamblin J, Honko A, Johnson J, et al. (2010) The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* 407: 256-267.
8. Peters CJ, Slone TW (1982) Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection. *J Med Virol* 10: 45-54.
9. Peters CJ, Andeson, J. (1981) Pathogenesis of Rift Valley Fever. *Contrib Epidemiol Biostat* 3: 21-41.
10. Anderson GW, Jr., Rosebrock JA, Johnson AJ, Jennings GB, Peters CJ (1991) Infection of inbred rat strains with Rift Valley fever virus: development of a congenic resistant strain and observations on age-dependence of resistance. *Am J Trop Med Hyg* 44: 475-480.
11. Bales JM, Powell DS, Bethel LM, Reed DS, Hartman AL (2012) Choice of inbred rat strain impacts lethality and disease course after respiratory infection with Rift Valley Fever Virus. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 105.
12. Gray KK, Worthy MN, Juelich TL, Agar SL, Poussard A, et al. (2012) Chemotactic and inflammatory responses in the liver and brain are associated with pathogenesis of Rift Valley fever virus infection in the mouse. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1529.
13. Guenet JL, Bonhomme F (2003) Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet* 19: 24-31.

14. do Valle TZ, Billecocq A, Guillemot L, Alberts R, Gomet C, et al. (2010) A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *J Immunol* 185: 6146-6156.
15. Tokuda S, Do Valle TZ, Batista L, Simon-Chazottes D, Guillemot L, et al. (2015) The genetic basis for susceptibility to Rift Valley fever disease in MBT/Pas mice. *Genes Immun.*
16. El-Akkad AM (1978) Rift Valley fever outbreak in Egypt. October--December 1977. *J Egypt Public Health Assoc* 53: 123-128.
17. Meegan JM (1979) The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 618-623.
18. Billecocq A, Gaudiard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, et al. (2008) RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology* 378: 377-384.
19. McGavran MH, Easterday BC (1963) Rift Valley Fever Virus Hepatitis: Light and Electron Microscopic Studies in the Mouse. *Am J Pathol* 42: 587-607.
20. Mims CA (1956) Rift Valley Fever virus in mice. III. Further quantitative features of the infective process. *Br J Exp Pathol* 37: 120-128.
21. Reed C, Steele KE, Honko A, Shamblin J, Hensley LE, et al. (2012) Ultrastructural study of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* 431: 58-70.
22. Bird BH, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST (2007) Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol* 81: 2805-2816.
23. Ikegami T (2012) Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Res* 95: 293-310.
24. Anderson GW, Jr., Smith JF (1987) Immunoelectron microscopy of Rift Valley fever viral morphogenesis in primary rat hepatocytes. *Virology* 161: 91-100.
25. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP (2012) Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335: 936-941.
26. Raberg L, Sim D, Read AF (2007) Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* 318: 812-814.

**Genetic dissection of Rift Valley fever pathogenesis:
Rfvs2 on mouse chromosome 11 impacts tolerance to early onset hepatitis**

Batista et al.

FIGURES

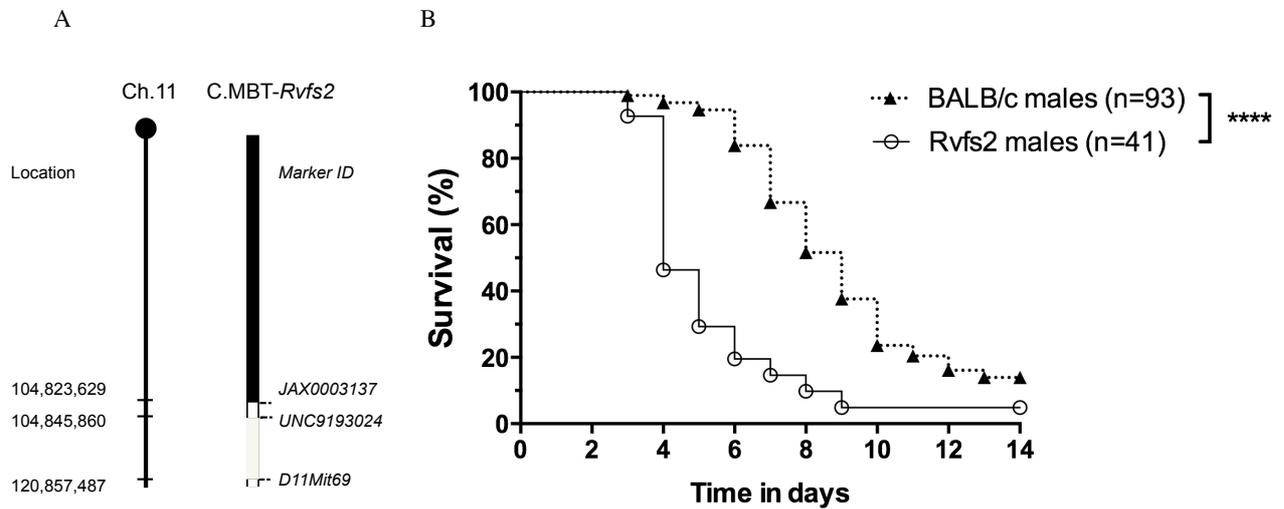


Figure 1. Schematic representation of the MBT-derived *Rvfs2* region in the congenic C.MBT-*Rvfs2* strain and the corresponding survival curve. (A) Haplotype structure of the congenic segment of chromosome 11 in C.MBT-*Rvfs2* (*Rvfs2*) congenic strain. The MBT-derived segment is depicted in grey on the BALB/c chromosome 11 background (black). Regions of unknown genotype are depicted in white. The genomic position of each marker is shown on the physical map (in bp). (B) Kaplan-Meier survival plots of N=41 *Rvfs2* (open circles) and N=93 BALB/c (dark triangles) male mice (Log-rank test; **P<0.0001)**

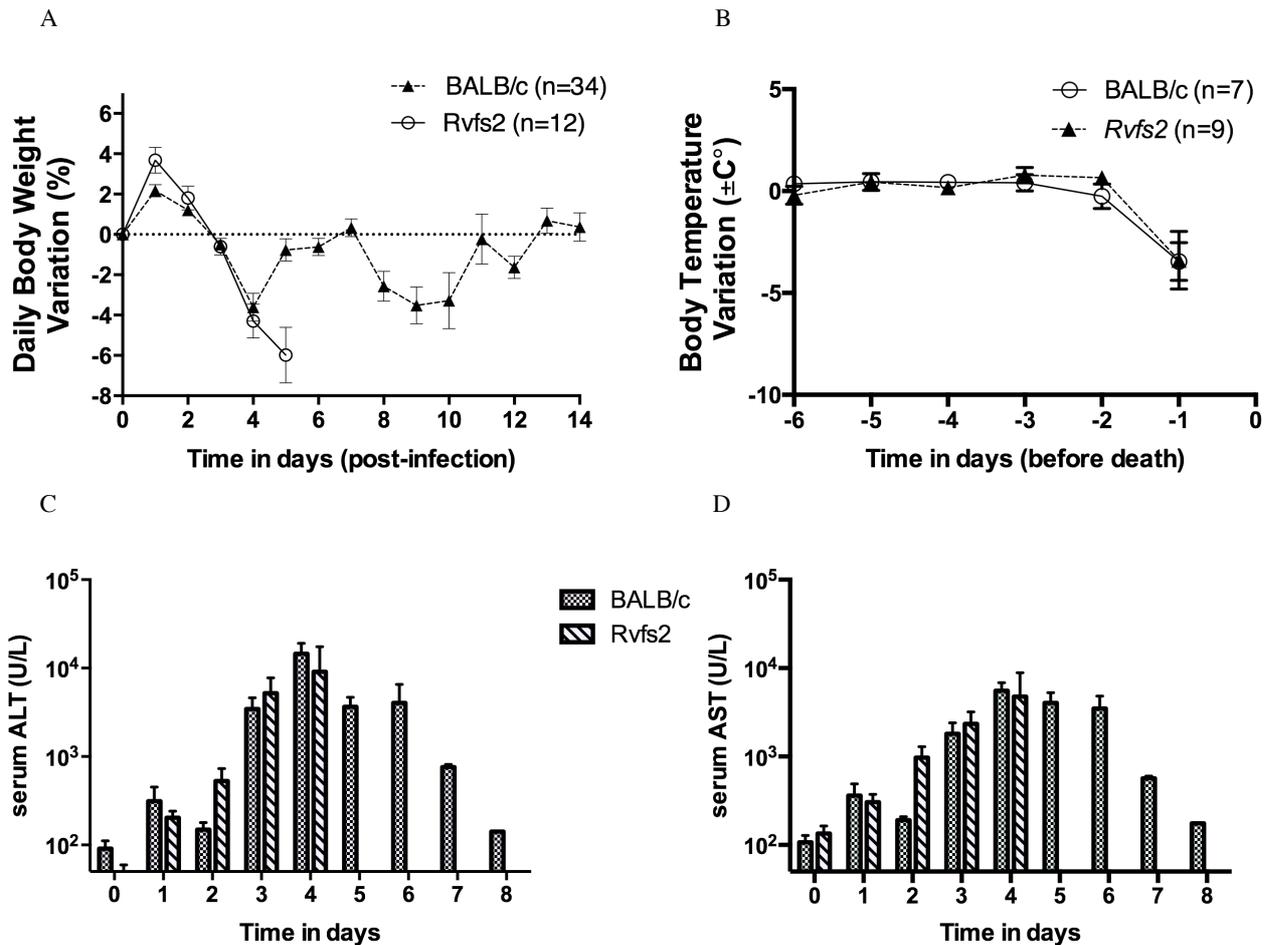


Figure 2. Clinical phenotypes of RVFV-infected C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c male mice. (A) The daily body weight variation in *Rvfs2* (open circles) and BALB/c (dark triangles) mice after infection with RVFV ZH548 were measured. Depicted are the means (SEM) of N=12 *Rvfs2* and N=26 BALB/c mice (two-way ANOVA, $P=0.54$). (B) The body temperature variation was measured in *Rvfs2* (open circles) and BALB/c (dark triangles) mice. Data is summarized with means (SEM) of N=9 *Rvfs2* and N=7 BALB/c (two-way ANOVA, 0.69). The horizontal axis depicts the time in days before the death of individual mice. (C) Analysis of the alanine aminotransferase (ALT) and (D) aspartate aminotransferase (AST) levels in the serum of N= 22 *Rvfs2* and N= 30 BALB/c mice. Error bars indicate means (SEM) for n= 4-9 mice per day, except for day 8 in BALB/c mice where N=1.

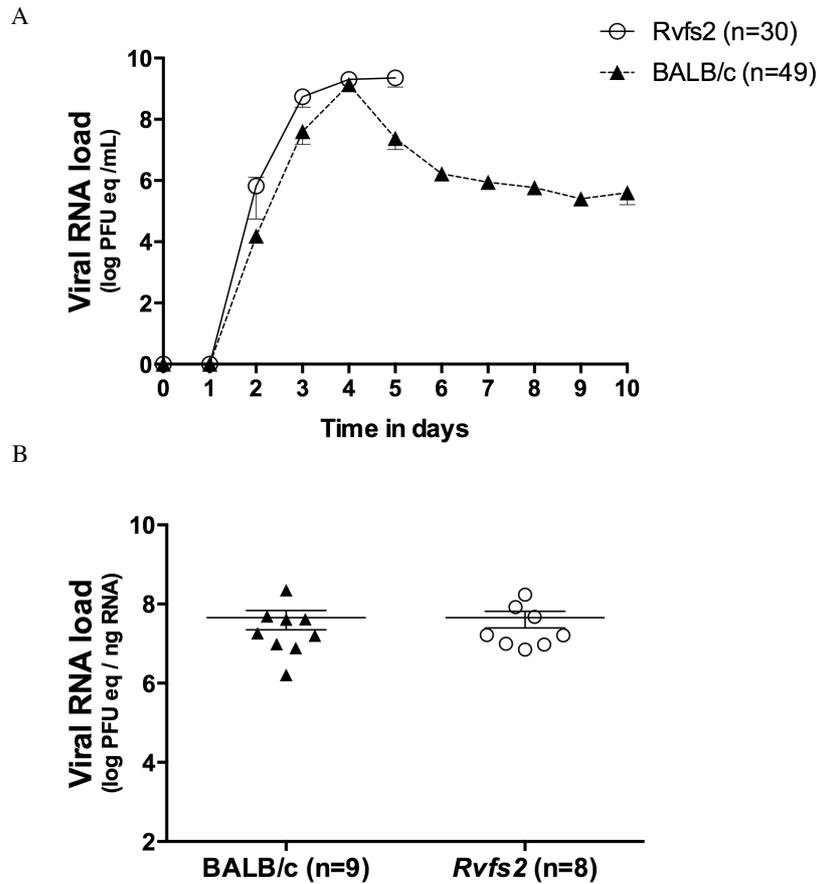


Figure 3. Viral RNA load in blood and liver of RVFV-infected C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c male mice. (A) Peripheral blood from N=30 *Rvfs2* (open circles) and N=49 BALB/c (dark triangles) mice was analyzed for viral RNA load by TaqMan RT-PCR. Data are expressed in log scale as equivalents of PFU copies per milliliter of blood. Depicted are the means (SEM) (two-way ANOVA, $P=0.17$). (B) RNA viral load in liver on day 3 post-infection was measured in *Rvfs2* (open circles) and BALB/c (dark triangles) mice. Data are expressed in log scale as equivalents of PFU copies per nanogram of total RNA. Means and SEM are displayed (log-rank Mann-Whitney test; $P=0.94$; $N= 8$ for *Rvfs2*, $N=9$ for BALB/c).

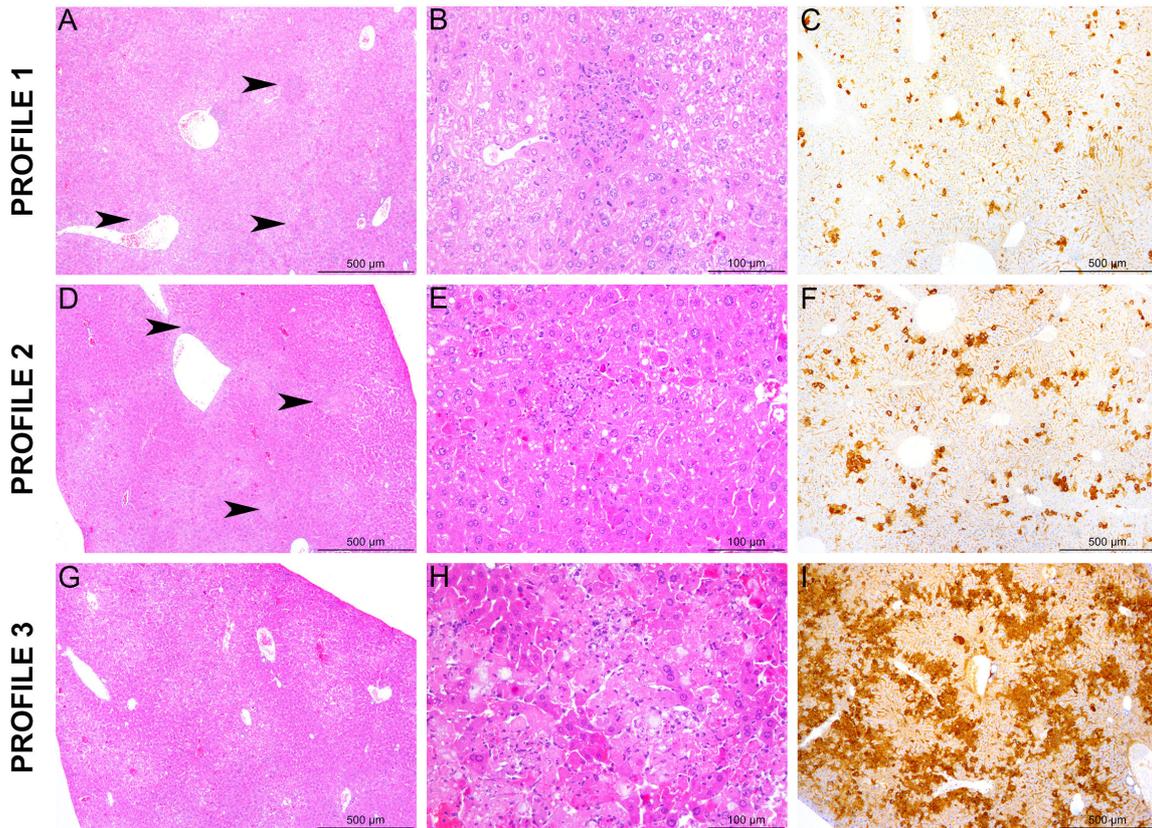


Figure 4. Histopathology and immunohistochemistry (IHC) analyses of liver from BALB/c and C.MBT-Rvfs2 on day 3 post-infection. Three different profiles unrelated to mouse genotype were observed. **Profile 1:** (A) Multifocal inflammatory lesions (arrowheads), randomly distributed, characterized by (B) small, well-delimited foci of hepatocyte necrosis/apoptosis and associated with neutrophil infiltration. (C) IHC analysis of N viral protein expression detected small clusters of positive hepatocytes. **Profile 2:** (D) Multifocal inflammatory lesions (arrowheads), randomly distributed, characterized by (E) more extensive and severe foci of hepatocyte necrosis/apoptosis than Profile 1, without inflammatory infiltration. (F) IHC analysis detected slightly larger clusters of labeled hepatocytes. **Profile 3:** (G,H) Massive necrosis/apoptosis of hepatocytes, (D) with a strong labeling of N viral protein, diffusely observed in the liver parenchyma. A, B, D, E: Hematoxylin and eosin staining; C, F, I: anti-N immunohistochemistry. Histology and IHC results shown are representative of experiments performed on at least 8 animals of each genotype.

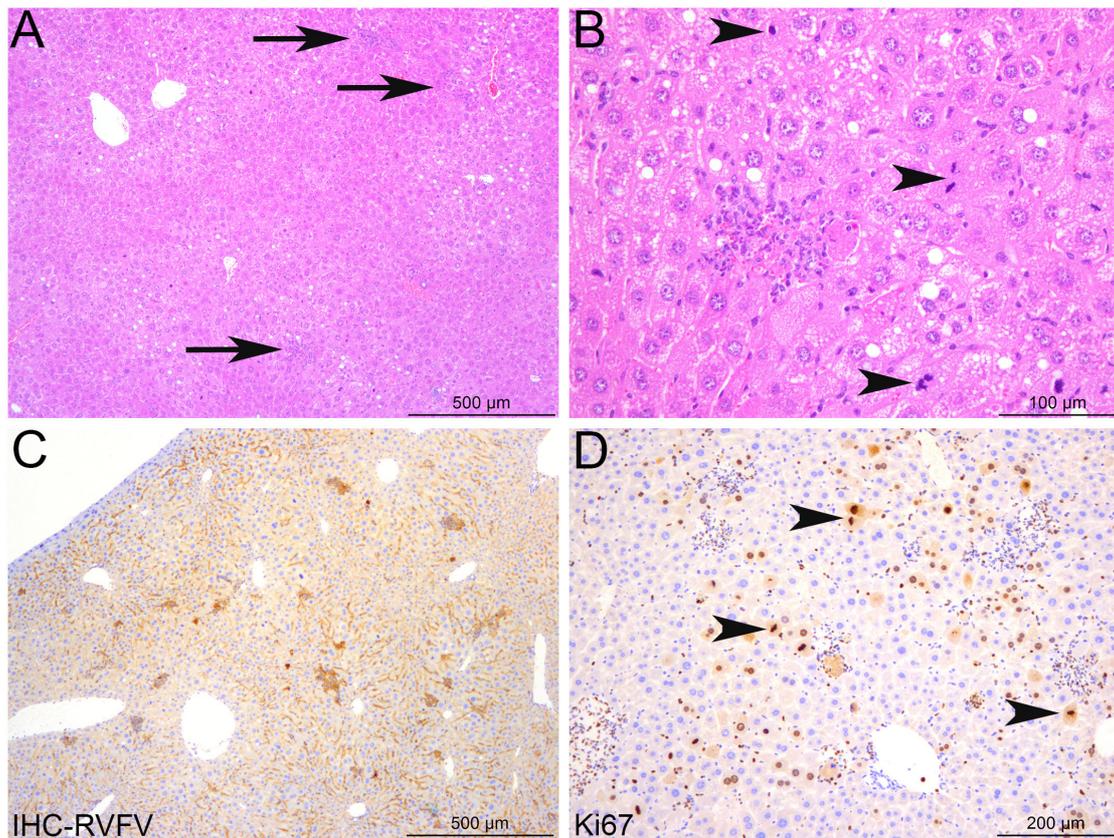


Figure 5. Hepatocyte proliferation and liver regeneration in BALB/c mice 6 days post infection. (A) Only rare lesions were detected (arrows), randomly distributed in the liver parenchyma. These lesions were characterized by (B) small infiltrates of inflammatory cells (neutrophils more frequently) associated with focal hepatocyte destruction. An increased number of mitoses was detected in hepatocytes (arrowheads). (C) Anti-N IHC analysis revealed a very low signal, only detected in the small foci identified in HE. (D) KI67 IHC highlighted a marked and diffuse proliferation of hepatocytes (mitoses: arrowheads), allowing the liver regeneration process in this condition. A, B: Hematoxylin and eosin staining; C: anti-N immunohistochemistry; D: Ki67 immunohistochemistry.

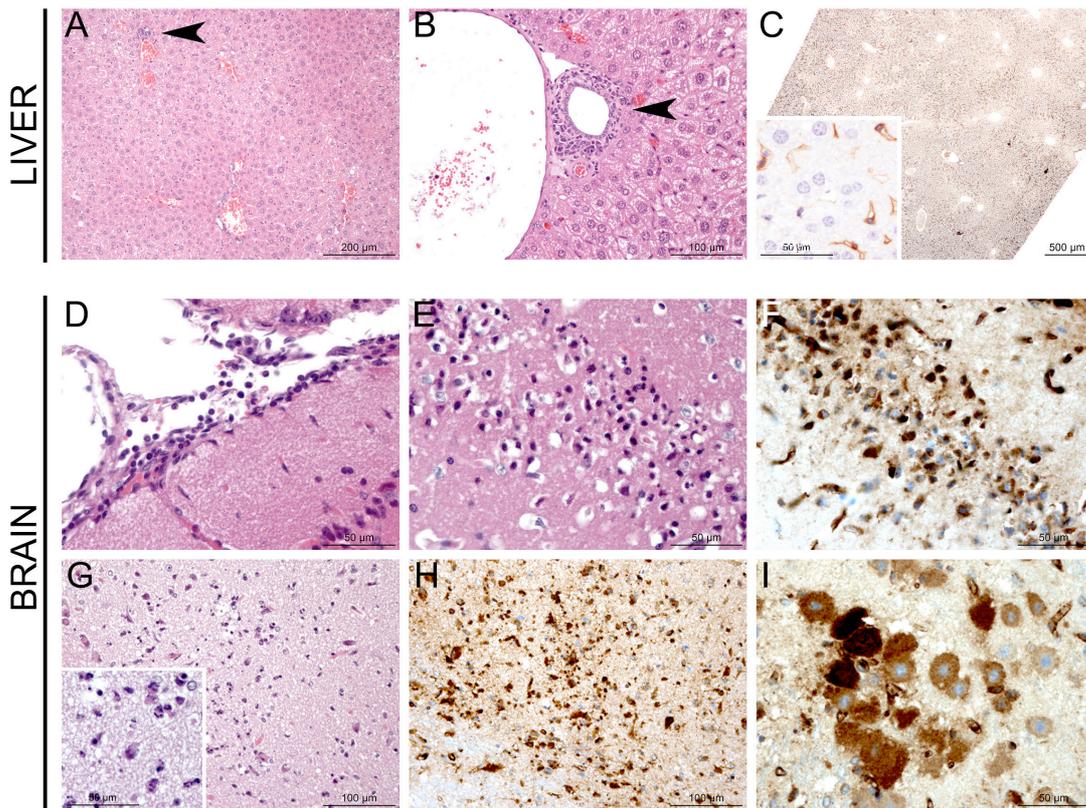


Figure 6. Histopathology and immunohistochemistry (IHC) analyses of liver and brain from moribund BALB/c. Liver from a moribund BALB/c mouse on day 8.5 post-infection displaying minimal multifocal inflammatory lesions, either (A) randomly distributed in the liver parenchyma (arrowhead), or (B) centered on portal tracts, mostly around bile ducts (arrowhead). (C) IHC analysis. Rare N-viral protein positive cells were identified. Note non-specific labeling of endothelial cells and endogenous peroxidase activity in red blood cells (inset). On days 7 to 9 post-infection, moribund BALB/c mice displayed different inflammatory and apoptotic/necrotic lesions in the CNS: (D) subacute leptomeningitis characterized by infiltration of leptomeninges by lymphocytes, plasma cells and neutrophils, (E) laminar apoptosis/necrosis of neurons in the cortical outer granular layer, (F) positive immunolabeling of N viral protein in neurons, and (G) necrotic/apoptotic foci in different locations of the cerebral grey matter with activation of microglial cells, infiltration of neutrophils (inset), and (H-I) strong positive N viral protein immunolabeling. A, B, D, E, G: Hematoxylin and eosin staining; C, F, H, I: anti-N immunohistochemistry. Histology and immunohistochemistry results shown are representative of experiments performed on at least 4 animals.

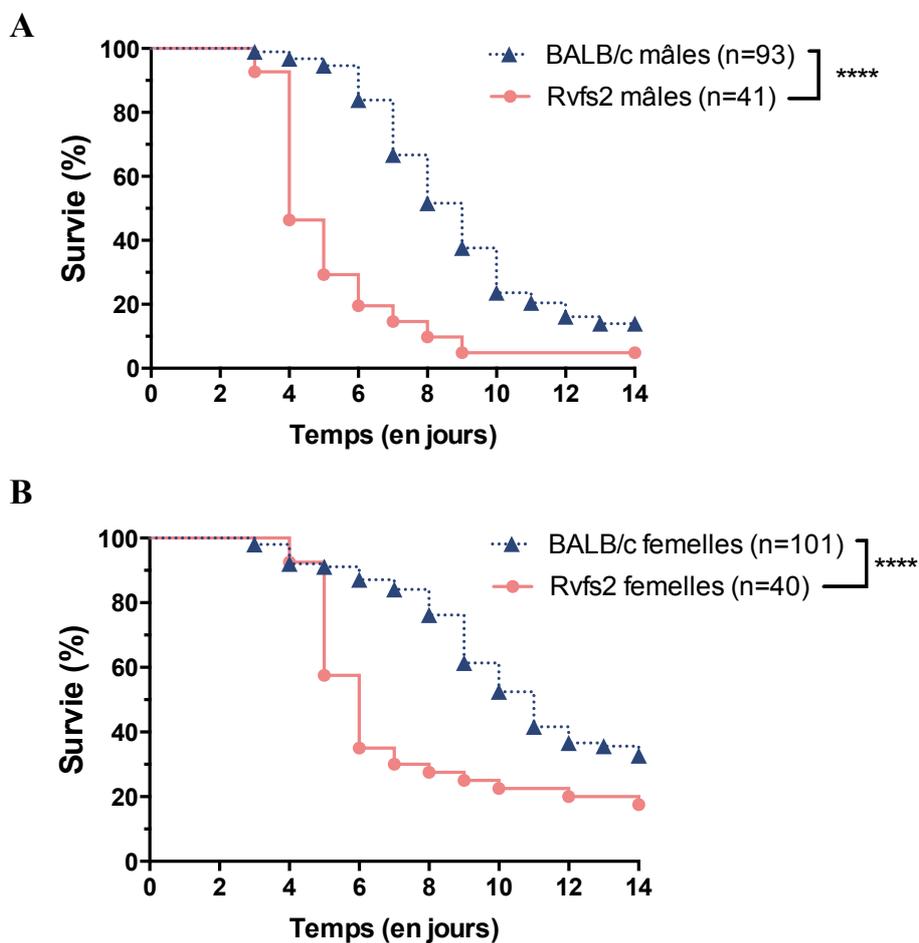


Figure 11: Survie des souris congéniques *Rvfs2*

Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles (A) et femelles (B) de la lignée congénique *Rvfs2*.

Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ****, $P < 0,0001$.

« [Hermès:] *Et cette fois, explique toi sans énigmes et appelle chaque chose par son nom* »²²

LA DISSECTION GÉNÉTIQUE DE L'INTERVALLE

RVFS2

1 *Rvfs2* module la sensibilité des souris à une infection par le VFVR

Afin de confirmer l'effet du QTL *Rvfs2* dans la réponse de la Souris à une infection par le VFVR, des souris congéniques C.MBT-*Rvfs2*, mâles et femelles, contenant l'intervalle génétique *Rvfs2* d'origine MBT dans un fonds génétique BALB/c ont été infectées par voie intrapéritonéale avec 100 PFU de la souche virulente du VFVR, ZH548. Comme il a été montré précédemment, la majorité des mâles de ce génotype sont morts entre les 3^{ème} et 5^{ème} jours après l'infection, alors que plus de 90% des mâles BALB/c ne meurent qu'à partir du 5^{ème} jour après l'infection (**Figure 11A**). La médiane de survie – délai dans lequel 50% des individus sont décédés, l'autre moitié étant encore vivante – a été chez les mâles BALB/c de 9 jours, et chez les mâles C.MBT-*Rvfs2* de seulement 4 jours après l'infection. Chez les femelles, nous avons observé un retard de la mortalité identique pour les deux génotypes : les femelles BALB/c ont présenté une médiane de survie de 11 jours, tandis que 50% des femelles C.MBT-*Rvfs2* sont mortes 6 jours après l'infection (**Figure 11B**). La différence de survie entre les deux génotypes est similaire chez les mâles et les femelles (Test du log-rank, $P < 0,0001$). En ce qui concerne le taux de survie à la fin des 14 jours d'observation, 14% des mâles BALB/c et 5% des mâles C.MBT-*Rvfs2* ont survécu. Chez les femelles, la survie a été plus élevée : respectivement 32% et 17,5% pour les BALB/c et les congéniques.

Ces résultats montrent que les souris C.MBT-*Rvfs2* sont particulièrement sensibles à une infection par le VFVR, confirmant l'effet important du locus *Rvfs2* sur le temps de survie et le dénouement de l'infection dans les deux sexes. Cela suggère la présence dans l'intervalle *Rvfs2* d'un gène ou d'un cluster de gènes impliqué dans la réponse de l'hôte à l'infection.

²² Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 936-976

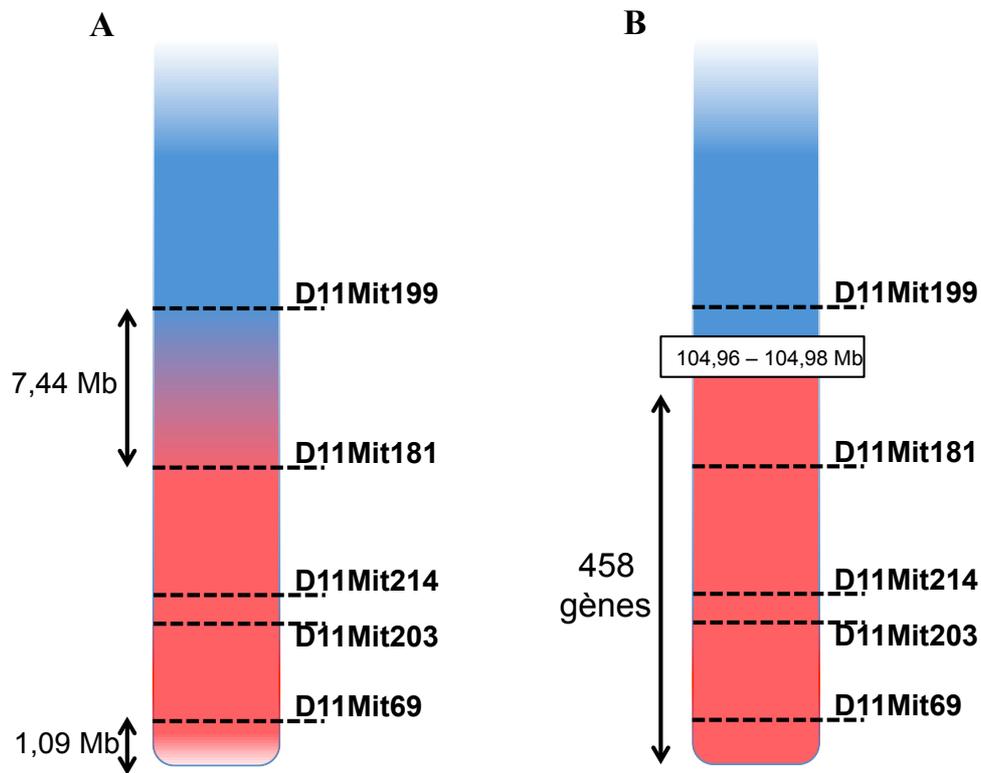


Figure 12: Schémas illustratifs de l'intervalle congénique *Rvfs2*

(A) *Rvfs2* avant le criblage par MegaMUGA. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les régions inconnues sont représentées par un dégradé entre les deux couleurs. La taille des régions inconnues est donnée en mégabases (Mb)

(B) *Rvfs2* après le criblage par MegaMUGA. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). La position du point de recombinaison et le nombre de gènes à l'intérieur de l'intervalle sont représentés.

2 L'intervalle génomique *Rvfs2* comporte plus de 400 gènes

Le segment génomique *Rvfs2* porté par les souris congéniques C.MBT-*Rvfs2* a été défini génétiquement par des microsatellites polymorphes entre les deux lignées parentales, MBT et BALB/c, qui recouvrent la région sub-télomérique du chromosome 11. *Rvfs2* a été délimité du côté proximal par le microsatellite *D11Mit181* et du côté distal par *D11Mit69*. La **Figure 12A** représente cette région et montre qu'au delà des deux marqueurs limitrophes – *D11Mit181* et *D11Mit69* – se présentaient de longues régions de génotype inconnu respectivement de 7,44 Mb et 1,09 Mb.

Afin d'identifier les bornes du segment chromosomique et de confirmer qu'aucun autre segment génomique en dehors de *Rvfs2* n'a été transféré lors de l'introgression de *Rvfs2* dans le fonds génétique BALB/c, la totalité du génome des souris congéniques C.MBT-*Rvfs2* a été génotypé à l'aide de la plateforme de génotypage MegaMUGA. Les puces à ADN MegaMUGA détectent 77 800 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* espacés de façon homogène tout le long du génome de la Souris (Neogen Corp., 2012). Nous avons comparé le génotype des souris congéniques C.MBT-*Rvfs2* à celui des souris MBT et BALB/c. Nous avons découvert que le point de recombinaison qui borne l'extrémité distale du segment *Rvfs2* est localisé entre les positions 104 962 315 et 104 984 546 du chromosome 11. Le segment d'origine MBT porté par la lignée congénique C.MBT-*Rvfs2* s'étend de cette position à l'extrémité télomérique. Ce segment d'environ 12,8 Mb comprend 458 gènes (**Figure 12B**). Aucune autre région d'origine MBT n'a été identifiée sur l'ensemble du génome des souris congéniques C.MBT-*Rvfs2*.

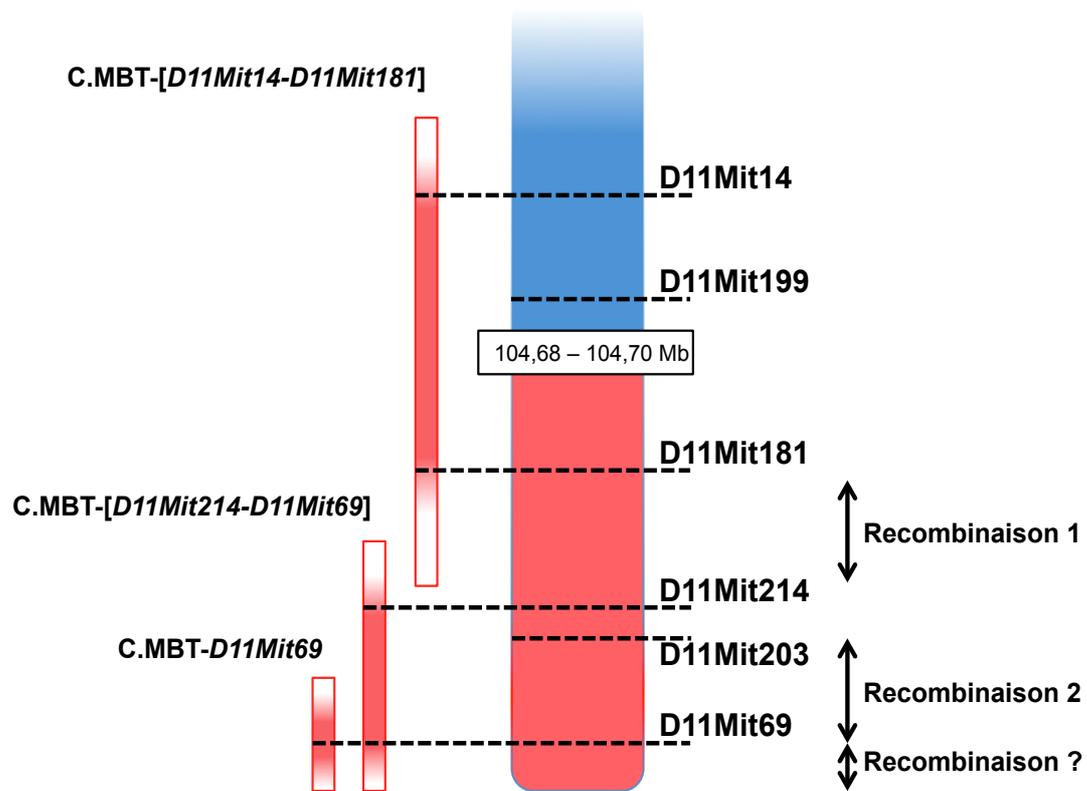


Figure 13: Schéma représentatif des segments sous-congéniques.

Haplotype du segment congénique du chromosome 11 et représentation des trois segments sous-congéniques. Les intervalles de recombinaison sont indiqués (à droite). La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les extrémités en blanc représentent les régions de génotype inconnu.

3 La dérivation de trois lignées consanguines sous-congéniques pour l'intervalle *Rvfs2*

Dans le but de réduire le nombre de gènes candidats, nous avons cherché à réduire la taille de l'intervalle *Rvfs2*. Pour ce faire, des mâles hétérozygotes C.MBT-*Rvfs2* ont été croisés avec des femelles BALB/c et les animaux résultants testés pour des événements de recombinaison à l'intérieur de *Rvfs2*. Selon la carte génétique consensus, la taille génétique de *Rvfs2* est d'environ 19 cM, nous nous attendions à observer 19 recombinants pour 100 souriceaux. Trois recombinants ont été caractérisés. Ils sont définis par les recombinaisons suivantes: i) une recombinaison unique entre les microsatellites *D11Mit14* et *D11Mit181*; ii) deux recombinaisons, entre *D11Mit181* et *D11Mit214*, et entre *D11Mit203* et *D11Mit69*, respectivement; iii) une recombinaison unique entre *D11Mit203* et *D11Mit69* (**Figure 13**). Le génotypage de marqueurs microsatellites ne nous a pas permis de déterminer si un événement de recombinaison avait eu lieu entre *D11Mit69* et l'extrémité télomérique chez le troisième recombinant. Des mâles recombinants hétérozygotes ont été accouplés avec des femelles de génotype identique pour produire des souris homozygotes. Des homozygotes ont ensuite été croisés entre eux afin d'établir les trois lignées consanguines sous-congéniques. Chacune de ces lignées sous-congénique porte une fraction de l'intervalle *Rvfs2*.

La première porte un segment proximal, elle est nommée : C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*]. La deuxième porte un segment médian, elle est nommée C.MBT-[*D11Mit214-D11Mit203*]. La troisième porte un segment distal contenant uniquement le marqueur *D11Mit69*, elle est nommée C.MBT-[*D11Mit69*] (**Figure 13**).

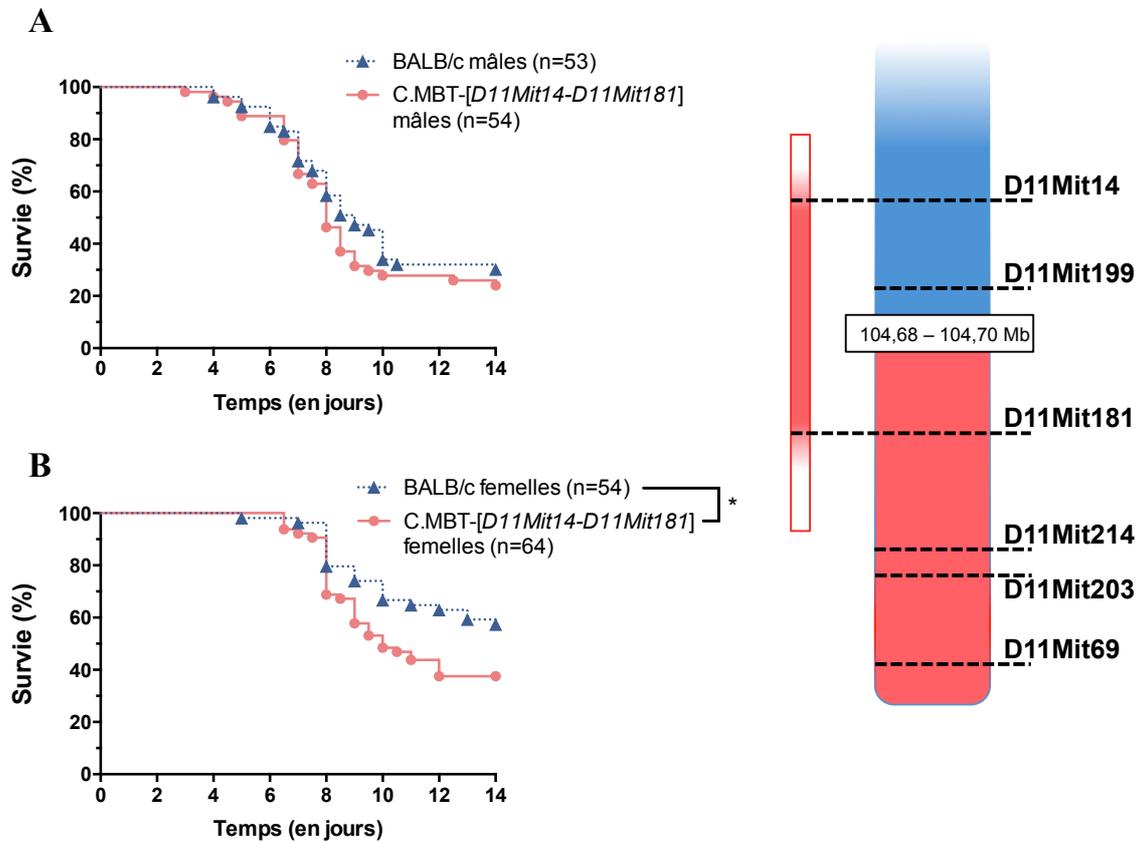


Figure 14: Survie des souris sous-congéniques C.MBT-[D11Mit14-D11Mit181].

À gauche: Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles (A) et femelles (B) de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit14-D11Mit181]. Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, *, $P < 0,05$.

À droite: Haplotype du segment congénique du chromosome 11 et représentation de l'intervalle sous-congénique délimité par les marqueurs *D11Mit14* et *D11Mit181*. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les extrémités en blanc représentent les régions de génotype inconnu.

4 Les souris C.MBT-[*D11Mit69*] présentent une sensibilité précoce au VFVR

À travers cette approche génétique, nous avons divisé le grand nombre de gènes de l'intervalle *Rvfs2* en trois groupes distincts portés par trois lignées indépendantes. Des souris de chaque lignée sous-congénique ont alors été inoculées avec la souche virulente ZH548 afin d'identifier la ou les lignées porteuses de la combinaison génétique conférant une sensibilité.

4.1 La sensibilité des souris C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] au VFVR

Nous avons infecté 54 mâles et 64 femelles de la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] portant le segment proximal. La sensibilité de ces souris a été comparée à celle d'un nombre équivalent de souris BALB/c des deux sexes. Plus de 50% des mâles sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] sont morts au jour 8 après l'infection. Un résultat identique a été obtenu avec les mâles BALB/c. Le taux de survie à la fin des 14 jours de l'observation était de 24% pour les mâles C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] et 30% pour les mâles BALB/c (**Figure 14A**). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les deux courbes de survie (Test log-rank, $P=0,31$). La médiane de survie après l'infection a été de 10 jours pour les femelles C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*]. Nous n'avons pas pu déterminer la médiane de survie chez les femelles BALB/c puisque le taux de survie à la fin de l'infection était supérieur à 50% (57%, **Figure 14B**). Ces résultats montrent qu'il existe une différence significative entre les femelles des deux génotypes (Test du log-rank, $P<0,05$). Bien que les femelles C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] aient été plus sensibles au VFVR que les femelles BALB/c, cette différence n'est apparue que tardivement, soit à partir du jour 8 après l'infection. Elle ne peut pas expliquer la sensibilité précoce des femelles de la lignée congénique parentale C.MBT-*Rvfs2*.

Collectivement, ces résultats nous ont permis de conclure que le segment proximal de *Rvfs2* ne contient pas le facteur génétique responsable de la sensibilité précoce des souris C.MBT-*Rvfs2* à une infection par le VFVR. Toutefois, nos résultats suggèrent l'existence de gènes à effet mineur agissant de façon spécifique chez la femelle pour conférer une sensibilité plus importante.

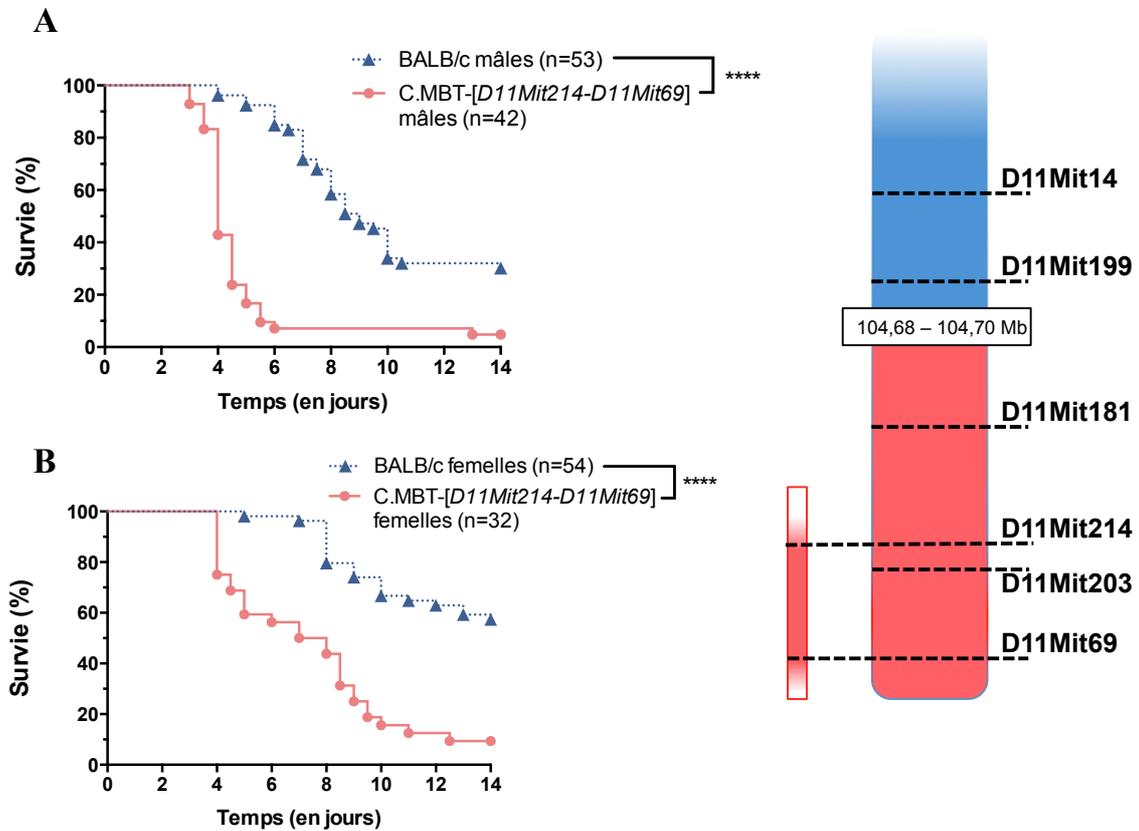


Figure 15: Survie des souris sous-congéniques C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69].

À gauche: Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles (A) et femelles (B) de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69]. Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ****, $P < 0,0001$.

À droite: Haplotype du segment congénique du chromosome 11 et représentation de l'intervalle sous-congénique délimité par les marqueurs D11Mit214 et D11Mit69. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les extrémités en blanc représentent les régions de génotype inconnu.

4.2 La sensibilité des souris C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69] au VFVR

Des souris mâles et femelles de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69] portant la partie médiane du locus *Rvfs2* ont été infectées et leur sensibilité a été comparée à celle de souris BALB/c. Parmi les 42 mâles C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69] infectés, 7 (16,7%) ont survécu au delà du 5^{ème} jour après l'infection, et 2 ont survécu à la durée de l'observation (14 jours). Cela représente un très faible taux de survie (inférieur à 5%) en comparaison du taux de survie de 30% observé chez des mâles BALB/c (**Figure 15A**). Nous avons infecté 32 femelles sous-congéniques C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69]. Cinquante pour cent sont mortes au jour 7,5 après l'infection : seulement 9% ont survécu jusqu'au 14^{ème} jour (**Figure 15B**). Le taux de survie diminué et la sensibilité précoce dans les deux sexes de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69] sont significativement différents de ceux observés chez les souris BALB/c (Test du log-rank, $P < 0,0001$). En outre, les courbes de survie des mâles et femelles C.MBT-[D11Mit214-D11Mit69] sont comparables à celles des mâles et femelles de la congénique parentale C.MBT-*Rvfs2*.

Ces résultats indiquent que le segment médian contient un facteur génétique responsable de la sensibilité précoce observée chez les deux sexes.

4.3 La sensibilité des souris C.MBT-[D11Mit69] au VFVR

Nous avons infecté par le VFVR 34 mâles et 37 femelles de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit69], portant le segment distal. La sensibilité de ces souris à l'infection a été comparée à celle de souris BALB/c. Plus de 90% des souris mâles sous-congéniques C.MBT-[D11Mit69], sont mortes entre les 3^{ème} et 5^{ème} jours après l'infection. Parmi les 34 mâles, aucun n'a survécu au delà du 7^{ème} jour après l'infection (**Figure 16A**). Ces résultats mettent en évidence une différence importante entre la sensibilité des mâles BALB/c et celle des mâles de la lignée sous-congénique C.MBT-[D11Mit69] (Test du log-rank, $P < 0,0001$). Chez les femelles, la médiane de survie après l'infection des souris sous-congéniques C.MBT-[D11Mit69] a été de 7 jours. Seulement 16% des femelles C.MBT-[D11Mit69] ont survécu au delà des 14 jours d'infection (**Figure 16B**). Une différence de sensibilité identique à celle des mâles a été observée entre les femelles C.MBT-[D11Mit69] et les femelles BALB/c (Test du log-rank, $P < 0,0001$).

L'ensemble des résultats de l'infection des souris C.MBT-[*D11Mit69*] montre que le segment distal, à l'instar du segment médian, contient un facteur génétique à l'origine de la sensibilité accrue des souris mâles et femelles C.MBT-*Ryfs2*.

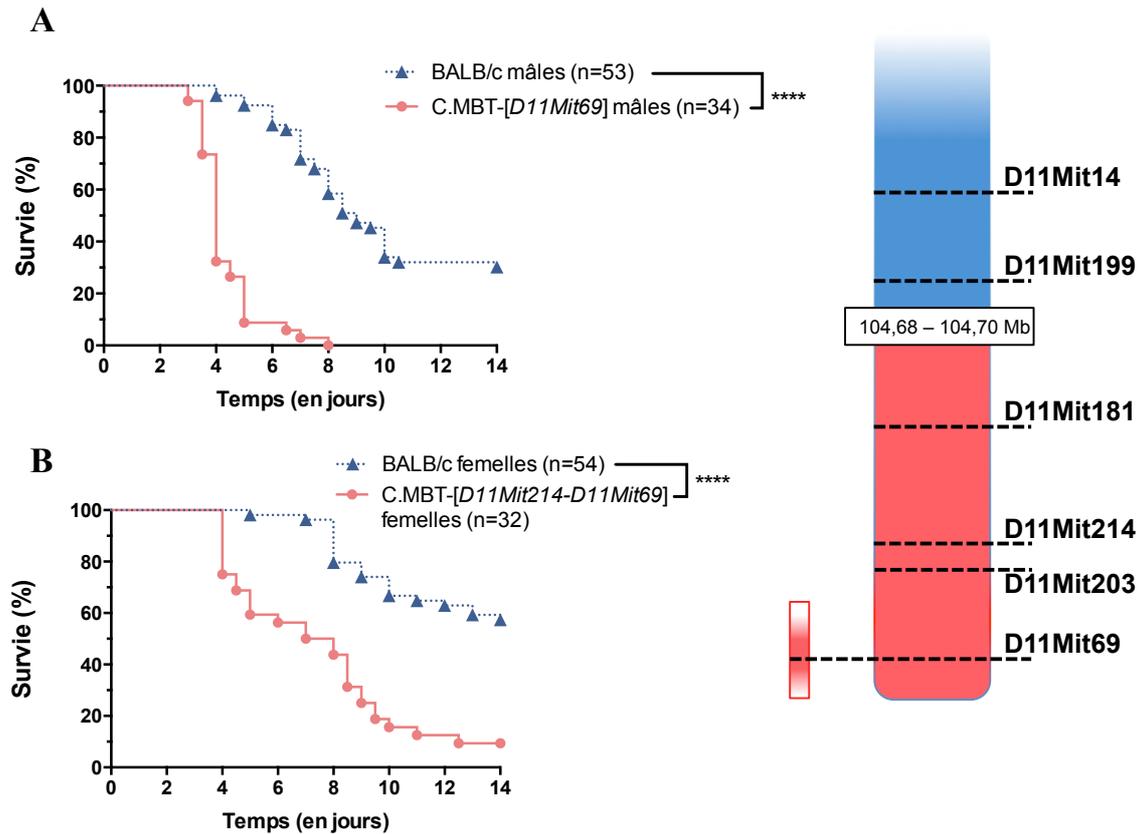


Figure 16: Survie des souris sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit69*] du sexe.

À gauche: Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles (A) et femelles (B) de la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit69*]. Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ****, $P < 0,0001$.

À droite: Haplotype du segment congénique du chromosome 11 et représentation de l'intervalle sous-congénique délimité par les marqueurs *D11Mit69*. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les extrémités en blanc représentent les régions de génotype inconnu.

4.4 La comparaison de la sensibilité des souris sous-congéniques

Comme la sensibilité des souris sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit214-D11Mit69*] et C.MBT-[*D11Mit69*] est similaire à la sensibilité de la congénique parentale C.MBT-*Rvfs2*, nous avons comparé les courbes de survie des deux lignées sous-congéniques entre elles. La **Figure 17** présente une superposition parfaite des courbes de survie des deux lignées sous-congéniques dans chacun des deux sexes. N'ayant pas trouvé de différence entre les deux lignées, nous proposons que le facteur génétique responsable de la sensibilité précoce est localisé dans la région génomique commune aux deux lignées, soit la totalité du segment distal du chromosome 11 porté par la lignée C.MBT-[*D11Mit69*].

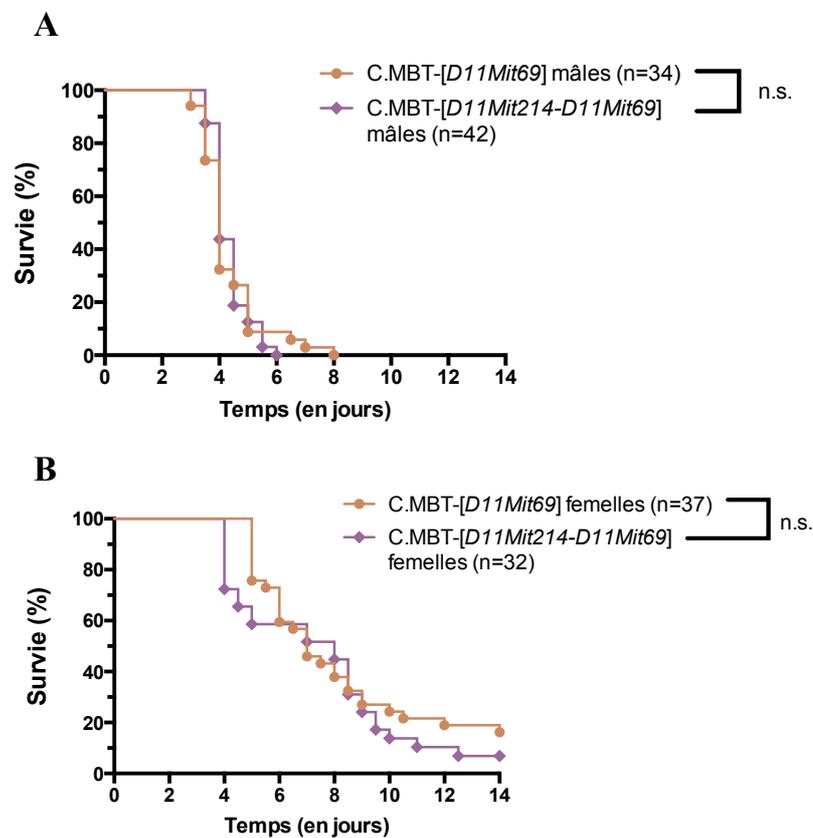


Figure 17: Courbes de survie des souris sous-congéniques.

Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles (A) et femelles (B) des lignées sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit214-D11Mit69*] et C.MBT-[*D11Mit69*]. Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, n.s., non significatif.

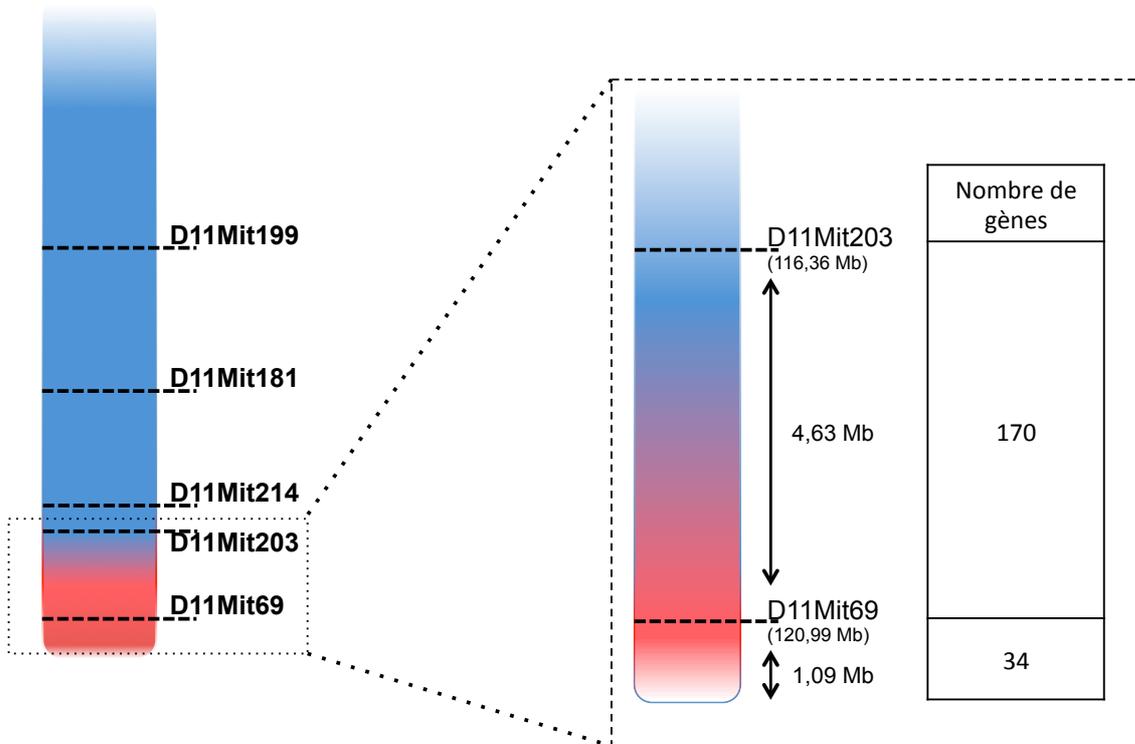


Figure 18: Schéma amplifié représentant l'extrémité du chromosome 11 de la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit69*].

La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu). Les régions inconnues sont représentées par un dégradé entre les deux couleurs. Leur taille et le nombre de gènes compris sont indiqués (à droite).

5 La dissection génétique du segment compris entre *D11Mit69* et le télomère

L'intervalle sous-congénique distal n'est défini que par un seul marqueur microsatellite polymorphe entre MBT et BALB/c : *D11Mit69*. Le microsatellite *D11Mit69*, situé entre les positions 120 996 173 et 120 996 339, est de génotype MBT chez la lignée C.MBT-[*D11Mit69*]. Le marqueur proximal *D11Mit203*, entre les positions 116 363 361 et 116 363 500, est de génotype BALB/c. Un segment d'une taille supérieure à 4 Mb, entre *D11Mit203* et *D11Mit69*, est de génotype inconnu. De plus, nous ne pouvions pas savoir si une recombinaison entre *D11Mit69* et le télomère du chromosome 11 avait eu lieu lors de la production de la sous-lignée C.MBT-[*D11Mit69*]. Le schéma de la **Figure 18** montre que l'ensemble des régions de génotype inconnu s'étendait sur 5,72 Mb et contenait environ 200 gènes.

5.1 La détermination des bornes de l'intervalle sous-congénique

Nous avons caractérisé le génotype des deux régions entourant *D11Mit69* et borné avec précision le segment MBT porté par la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit69*]. Nous avons tiré parti des SNPs polymorphes entre les lignées parentales identifiés grâce à la puce MegaMUGA. Le génotype des SNPs sélectionnés chez les souris C.MBT-[*D11Mit69*] a été déterminé par la technique du pyroséquençage.

5.1.1 La détermination de la borne proximale

Dans un premier temps, nous avons sélectionné 3 SNPs fractionnant la région entre *D11Mit203* et *D11Mit69* en 4 segments de taille équivalente, comme illustré sur la **Figure 19**. Les résultats du pyroséquençage pour chaque SNP sont schématisés dans le **Tableau 1**. La recombinaison à l'origine des souris C.MBT-[*D11Mit69*] a eu lieu entre les SNPs *UNC20505680* et *UNC20520758*, entre les positions 118,74 Mb et 119,94 Mb.

Dans un deuxième temps, nous avons divisé l'intervalle de 1,2 Mb entre ces deux SNPs – *UNC20505680* et *UNC20520758* – en 6 segments de taille équivalente à l'aide de 5 SNPs (**Figure 19**). Le génotype de chaque SNP a été déterminé. Le **Tableau 1** montre que la recombinaison s'est produite entre les SNPs *UNC20511520* (119,19 Mb) et *JAX00032412*

(119,34 Mb). Nous avons augmenté la résolution pour localiser finement le point de recombinaison. La taille de l'intervalle de génotype incertain a ainsi été réduite de 4,6 Mb à 150 kb, diminuant le nombre de gènes de génotype incertain de 170 à 8.

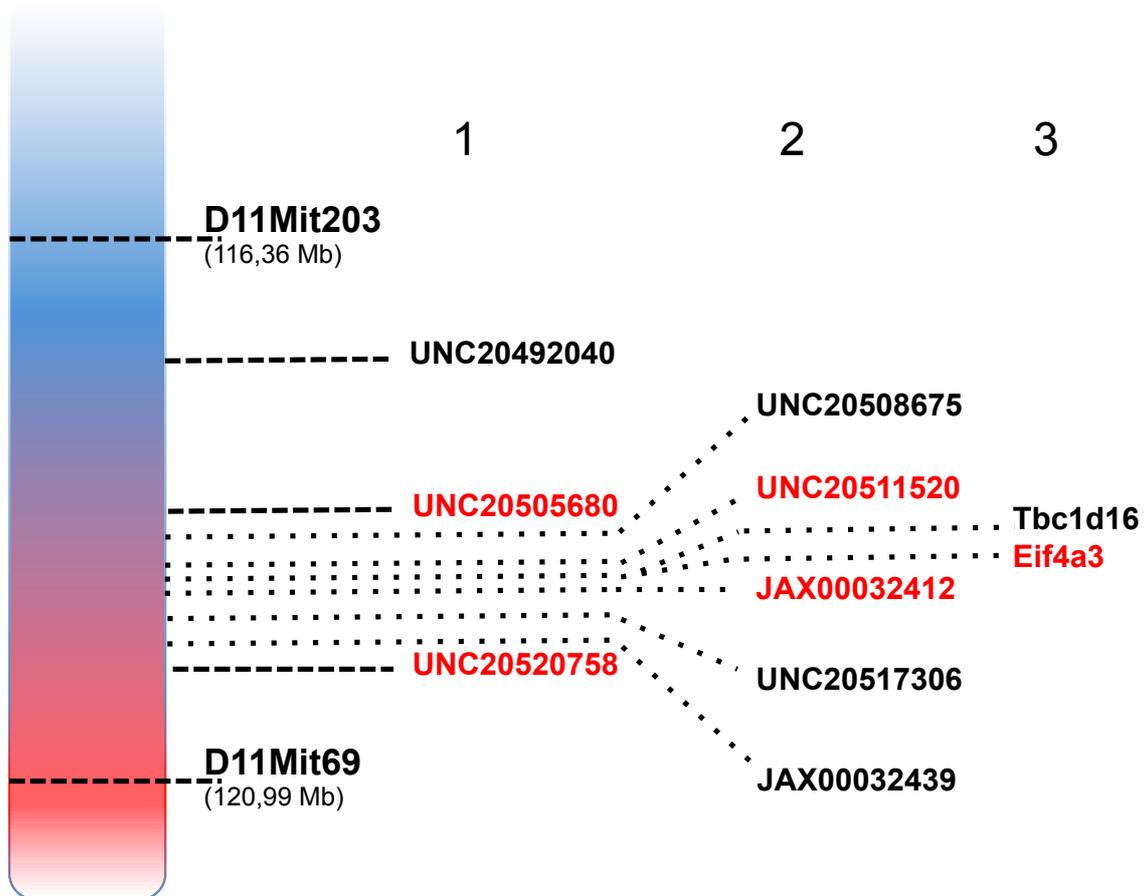


Figure 19: Stratégie utilisée pour la détermination de la borne proximale de l'intervalle *Rvfs2* porté par les souris C.MBT-[*D11Mit69*].

Notre stratégie a consisté en trois parties : (1) le séquençage de trois SNPs équidistants entre les marqueurs *D11Mit203* et *D11Mit69* ; (2) le séquençage de 5 SNPs équidistants entre le SNP d'origine BALB/c *UNC20505680* et le SNP d'origine MBT *UNC20520758* ; (3) la détection d'INDELS dans les gènes *Tbc1d16* et *Eif4a3*.

Ayant atteint la plus grande résolution permise par la densité des SNPs dans la région, nous avons changé de stratégie pour connaître le génotype des 8 gènes restants. Nous avons choisi deux Insertions/Deletions (INDELs) connues, polymorphes entre les lignées parentales et présentes dans les gènes *Tbc1d16* (à l'extrémité proximale, 119,23 Mb) et *Eif4a3* (à l'extrémité distale, 119,3 Mb). Des amorces ont été dessinées de sorte que la présence ou l'absence de la délétion puisse être détectée par PCR classique. Les résultats ont montré que les deux gènes sont chez la souris sous-congénique C.MBT-[*D11Mit69*] de génotype BALB/c (**Tableau 1**). Cela nous permet de conclure que la majorité de l'intervalle de 150 kb est d'origine BALB/c et que seuls les 40 kb les plus distaux sont de génotype inconnu. Cette région de génotype inconnu comprend le gène *Card14* en totalité.

			BALB/cByJ	MBT/Pas	C.MBT- [<i>D11Mit69</i>]
D11Mit203			B	M	B
UNC20492040			T	C	T
UNC20505680			T	C	T
	UNC20508675		T	C	T
	UNC20511520		A	G	A
		Tbc1d16	B	M	B
		Eif4a3	B	M	B
	JAX00032412		C	T	T
	UNC20517306		C	A	A
	JAX00032439		A	G	G
UNC20520758			G	A	A
D11Mit69			B	M	M

Tableau 1: Génotypes obtenus pour la borne proximale à travers l'approche du pyroséquençage et l'identification des INDELs.

Les nucléotides pour chaque SNP testé sont indiqués par les lettres A, C, T, G. Les nucléotides représentés en rouge sont dérivés de la lignée MBT, les nucléotides bleus de la lignée BALB/c.

Les lettres M (MBT) ou B (BALB) indiquent la provenance génétique du marqueur ou INDEL génotypés.

	BALB/cByJ	MBT/Pas	C.MBT- [D11Mit69]
D11Mit69	B	M	M
JAX00199632	C	T	T
JAX00323817	A	G	G
UNC20538837	T	C	C
UNC20540083	T	C	C
UNC20540857	T	C	C

Tableau 2: Génotypes entre le marqueur *D11Mit69* et le télomère du chromosome 11 obtenus à l'aide de la technique du pyroséquençage.

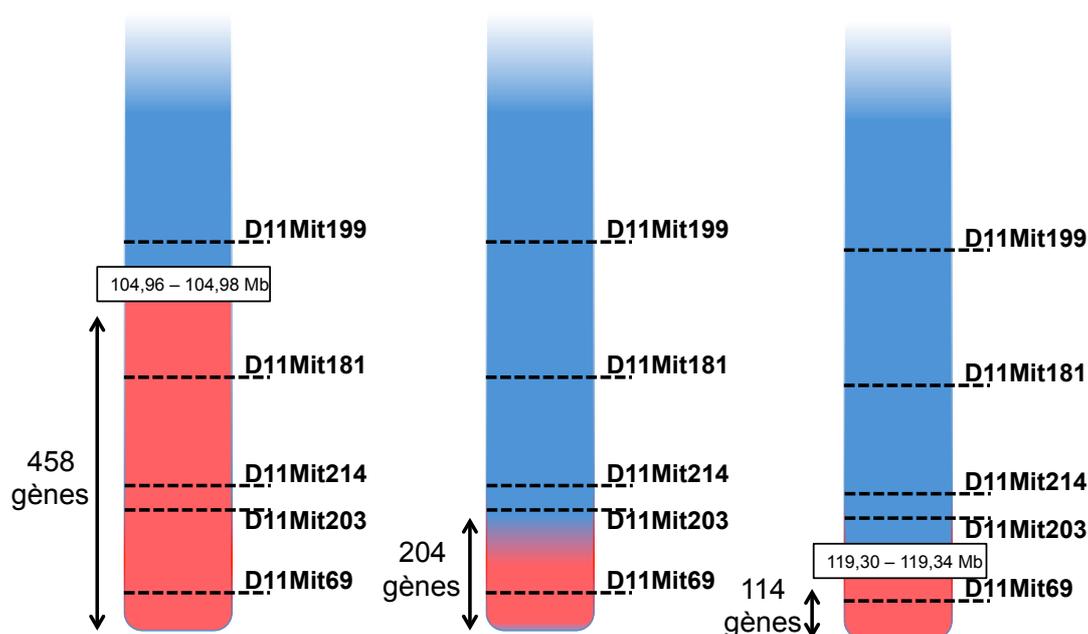


Figure 20 : Schéma illustrant la diminution de la taille et du nombre de gènes contenus au locus *Rvfs2* au cours de l'analyse génétique et fonctionnelle des lignées sous-congéniques.

À gauche : région congénique *Rvfs2* ; Au milieu : région sous-congénique de C.MBT-[*D11Mit69*] avant la détermination des bornes ; À droite : région sous-congénique de C.MBT-[*D11Mit69*] après la détermination des bornes.

5.1.1 La détermination de la borne distale

Une approche similaire a été appliquée pour rechercher une recombinaison dans la région comprise entre *D11Mit69* et le télomère du chromosome 11. Comme tous les SNPs testés à ce jour portent un allèle MBT (**Tableau 2**), nous concluons qu'aucune recombinaison n'a eu lieu du côté distal du microsatellite *D11Mit69*.

*

Les résultats des expériences de pyroséquençage des SNPs et d'amplification des INDELS indiquent que les souris sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit69*] comportent une région d'origine MBT de 2,70 Mb qui recouvre l'extrémité télomérique du chromosome 11. Cela correspond à un segment chromosomique contenant 114 gènes (**Figure 20**).

En conclusion, la production et l'analyse génétique et fonctionnelle de la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit69*], qui porte le segment distal de *Rvfs2*, a permis de réduire d'un facteur 5 la taille génomique de l'intervalle et le nombre de gènes candidats d'un facteur 4.

5.2 Une dominance incomplète caractérise la relation entre les allèles au locus *Rvfs2*

Afin de mieux comprendre le type de changement entre les allèles BALB/c ou MBT qui modulent la sensibilité précoce des souris, nous nous sommes intéressés au rapport de dominance entre ces allèles. Pour répondre à cette question, nous avons infecté plus de 60 mâles F1 issus du croisement entre des souris C.MBT-[*D11Mit69*] et BALB/c et avons mesuré leur survie. Les mâles F1 ont commencé à mourir très tôt après infection et seulement 56% d'entre eux ont survécu jusqu'au 5^{ème} jour après l'infection, tandis que 91% des mâles BALB/c étaient encore vivants. Par ailleurs, le taux de survie des mâles F1 au 5^{ème} jour était très différent de celui des mâles C.MBT-[*D11Mit69*] infectés, puisque 92% d'entre eux étaient déjà morts (**Figure 21**). La comparaison des médianes de survie entre les mâles des trois génotypes, C.MBT-[*D11Mit69*], F1 et BALB/c (4, 7 et 8,5 jours après l'infection, respectivement), indique que la médiane des souris F1 se rapproche de celle des souris BALB/c. En revanche, la comparaison du taux de survie à la fin de l'expérience (0%, 3%, et

30%, respectivement) montre que les souris F1 ressemblent plutôt aux souris sous-congéniques C.MBT-[D11Mit69]. Dans l'ensemble, les différences de courbe de survie des souris F1 par rapport à chacune des courbes des lignées parentales (C.MBT-[D11Mit69], BALB/c) sont équivalentes (Test log-rank, $P < 0,0001$).

Ces résultats montrent que les souris F1 présentent un phénotype intermédiaire entre la souris C.MBT-[D11Mit69] et la souris BALB/c. Cela indique une relation de dominance incomplète entre les allèles parentaux, ce qui suggère que la sensibilité résulte d'un effet dose du produit codé par le gène impliqué.

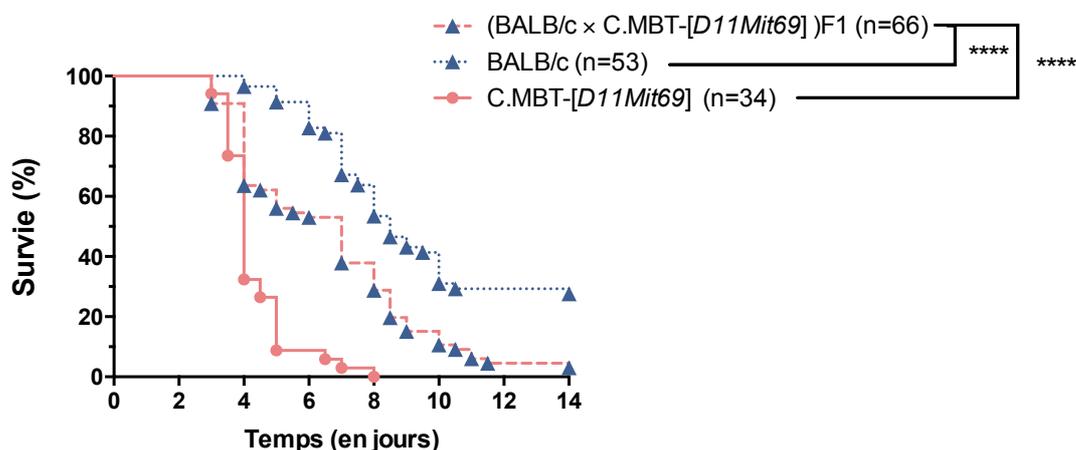


Figure 21 : Survie d'individus (BALB/c × C.MBT-[D11Mit69])F1.

Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des souris mâles issus du croisement de souris BALB/c et C.MBT-[D11Mit69].

Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ****, $P < 0,0001$.

5.3 Deux lignées de la sous-espèce *M. musculus musculus* présentent une sensibilité précoce à la FVR

La découverte de trois QTLs associés à une sensibilité au VFVR par une analyse de liaison génétique et la confirmation de leur existence par l'étude phénotypique de lignées congéniques et sous-congéniques ont démontré qu'une partie de la variabilité phénotypique entre les souris BALB/c et MBT est liée à la divergence génétique entre ces deux lignées. MBT étant dérivée de souris sauvages de la sous-espèce *M. musculus musculus*, nous nous sommes demandé si le phénotype de sensibilité est partagé par d'autres lignées de la même sous-espèce.

Des mâles de la lignée PWK/Pas dérivée de progéniteurs sauvages de la sous-espèce *M. musculus musculus* ont été infectés par la souche ZH548 du VFVR. Plus de la moitié des mâles PWK/Pas infectés sont morts entre les 3^{ème} et 4^{ème} jours après l'infection. Seulement 17% des souris ont survécu au delà du 5^{ème} jour et le taux de survie à la fin de l'expérience a été de 11% (**Figure 22**). La courbe de survie des souris PWK/Pas est significativement différente de celle des souris BALB/c (Test du log-rank, $P < 0,001$). Les mâles PWK/Pas sont plus sensibles que les mâles BALB/c à la fièvre de la Vallée du Rift, tout comme les mâles MBT.

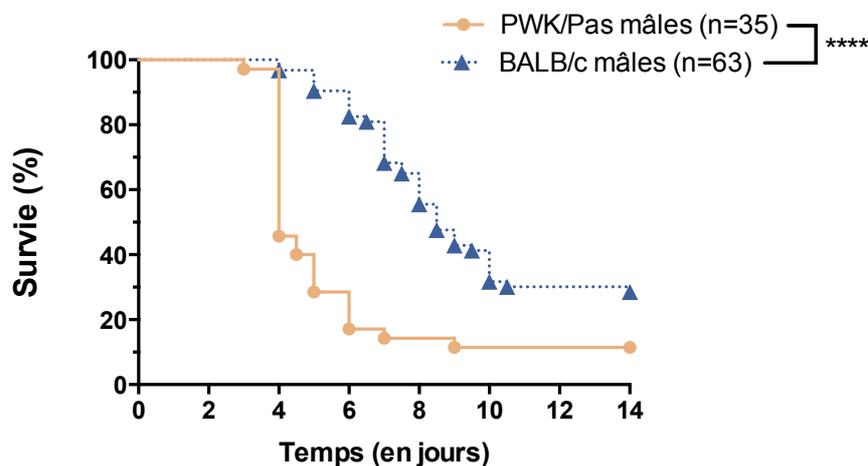


Figure 22 : Survie de la lignée PWK/Pas

Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des souris mâles de la lignée sauvage PWK/Pas.

Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ****, $P < 0,0001$.

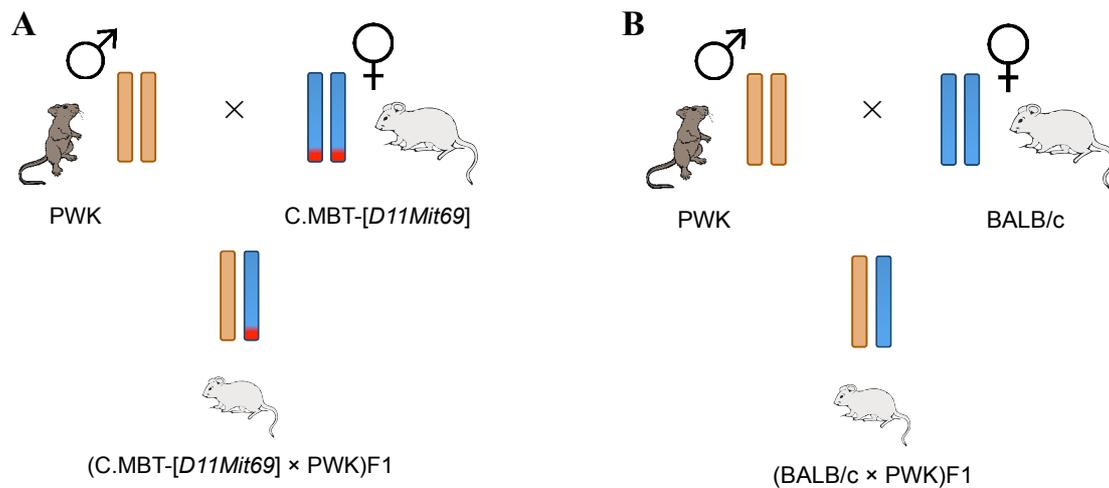


Figure 23 : Schémas des croisements effectués pour le test de complémentation.

- A) Une souris mâle de la lignée sauvage PWK/Pas a été croisée avec des femelles de la lignée sous-congénique C.MBT-*[D11Mit69]* afin d'obtenir des individus (C.MBT-*[D11Mit69]* × PWK)F1.
- B) Une souris mâle de la lignée sauvage PWK/Pas a été croisée avec des femelles de la lignée BALB/c afin d'obtenir des individus (BALB/c × PWK)F1.

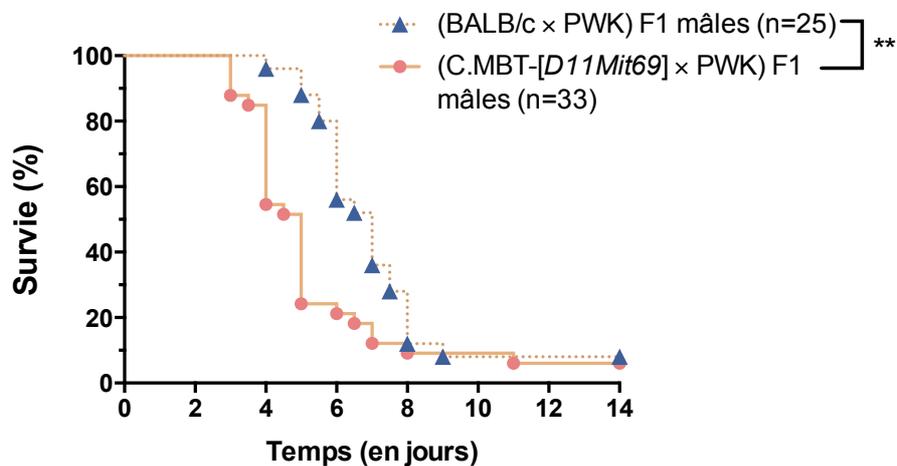


Figure 24 : Test de complémentation

Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des souris mâles (BALB/c × PWK)F1 et (C.MBT-*[D11Mit69]* × PWK)F1.

Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, **, $P < 0,01$.

5.4 La mutation impliquée dans la sensibilité précoce est commune aux lignées consanguines MBT et PWK/Pas

En vue de déterminer si une même mutation de la région *Rvfs2* est impliquée dans la sensibilité de la lignée PWK/Pas et de la lignée MBT, nous avons conçu un test de complémentation fonctionnelle du QTL. Des souris mâles de la lignée PWK/Pas ont été croisées avec des femelles des deux lignées C.MBT-[*D11Mit69*] et BALB/c. Les mâles F1 issus du croisement d'un mâle PWK/Pas et de femelles de la lignée sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit69*] sont notés (*D11Mit69* × PWK)F1 (**Figure 23A**). Les mâles F1 issus du croisement d'un mâle PWK/Pas et de femelles BALB/c sont notés (BALB/c × PWK)F1 (**Figure 23B**). La **Figure 24** montre les courbes de survie d'une trentaine de mâles de chacune des F1. Les mâles (BALB/c × PWK)F1 présentent une médiane de survie de 7 jours après l'infection. Cinquante pour cent des mâles (*D11Mit69* × PWK)F1 sont morts au 5^{ème} jour de l'expérience. Ces derniers sont donc plus sensibles que les mâles (BALB/c × PWK)F1.

Aucune différence entre les deux F1s n'est observée dans le taux de survie à l'issue de l'expérience, au jour 14 après l'infection. Cependant les courbes de survie sont significativement différentes (Test du log-rank, $P < 0,005$), ce qui indique que l'haplotype PWK/Pas ne complémente pas la mutation portée au locus *Rvfs2* d'origine MBT. Ces résultats suggèrent que la mutation responsable de la sensibilité précoce des souris C.MBT-[*D11Mit69*] est également présente dans le génome des souris PWK/Pas.

5.5 L'identification et l'établissement de la lignée recombinante C.MBT-*Rec1*

Nous souhaitons identifier parmi les 114 gènes de l'intervalle critique, un gène portant une mutation commune aux génomes PWK/Pas et MBT et qui montre une dominance incomplète lorsqu'il est placé en face de l'allèle BALB/c. Pour simplifier notre tâche, nous avons cherché à réduire davantage l'intervalle critique. Dans ce but, nous avons accouplé un mâle C.MBT-[*D11Mit69*] hétérozygote avec des femelles BALB/c (**Figure 25, gauche**). La technique de pyroséquençage de SNPs et la détection des INDELS ont été utilisées pour identifier des recombinants dans l'intervalle critique. Les SNPs et les INDELS utilisés, ainsi que leurs positions relatives, sont représentés sur la **Figure 25**. Un mâle recombinant a été identifié. Son génotype était MBT pour tous les marqueurs compris entre les gènes *Eif4a3*

(119,30 Mb) et *Tex19.2* (121,12 Mb). Nous avons conclu que cet individu était issu d'une recombinaison en position distale par rapport au microsatellite *D11Mit69*, avec pour conséquence la perte des allèles MBT à l'extrémité télomérique (**Figure 26, droite**). La nouvelle région recombinée contenait 88 gènes portant un allèle MBT.

Ensuite, le mâle recombinant, nommé C.MBT-*Rec1* (pour « Recombinant #1 »), a été accouplé avec des femelles BALB/c et des souriceaux ayant reçu le segment recombinant d'origine MBT ont été identifiés. Le croisement de mâles et de femelles hétérozygotes a permis d'obtenir des individus C.MBT-*Rec1* homozygotes pour le segment de génotype MBT dans un fonds génétique BALB/c.

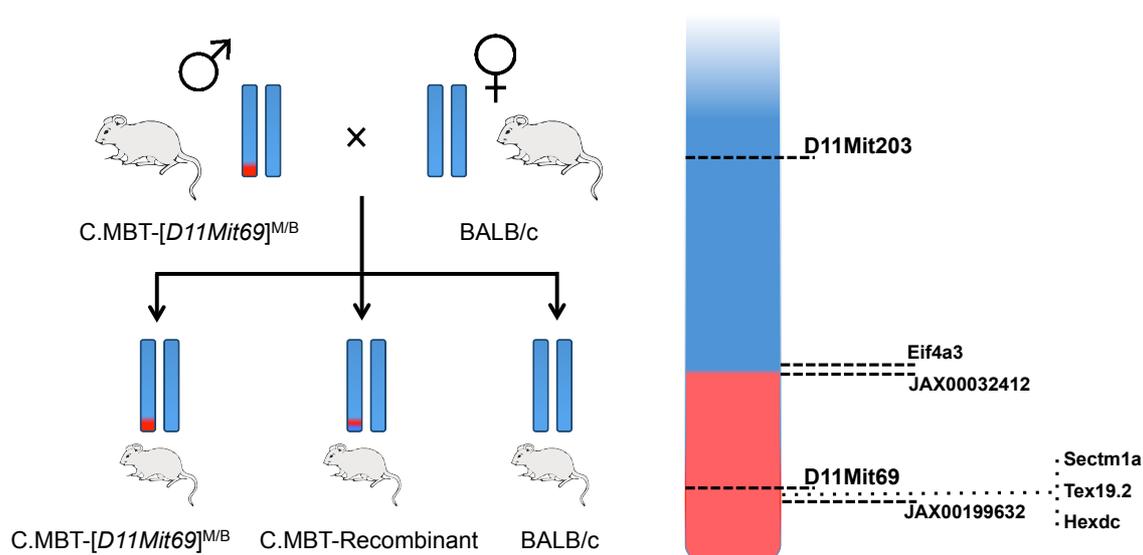


Figure 25 : Stratégie de production et identification d'individus recombinants

À gauche: Schéma du croisement à l'origine des souris recombinantes au locus *Rvfs2*. Les régions du chromosome 11 d'origine BALB/c (bleu) et MBT (rouge) sont représentées.

À droite: Position des marqueurs utilisés pour génotyper les souris issues du croisement décrit.

5.6 Les souris C.MBT-*Rec1* sont sensibles à une infection par le VFVR

Afin de caractériser la sensibilité des souris C.MBT-*Rec1*, 6 souris mâles de la lignée C.MBT-*Rec1* ont été infectées par 100 PFU du VFVR. Un nombre identique de souris BALB/c a été infecté simultanément et la survie des deux groupes surveillée. Les souris BALB/c ont commencé à mourir au 6^{ème} jour et deux souris BALB/c ont survécu aux 14 jours de l'expérience. Les souris C.MBT-*Rec1* sont toutes mortes au jour 4,5 après l'infection (**Figure 26**). Bien que le nombre de souris utilisé eût été faible, nous avons mis en évidence une différence significative entre les deux courbes de survie (Test du log-rank, $P < 0,001$). Nous avons conclu que les souris C.MBT-*Rec1* présentent une sensibilité précoce au VFVR comparable à celle observée chez la lignée C.MBT-[*D11Mit69*]. L'intervalle d'origine MBT porté par les souris C.MBT-[*D11Mit69*] contient le gène responsable de cette sensibilité.

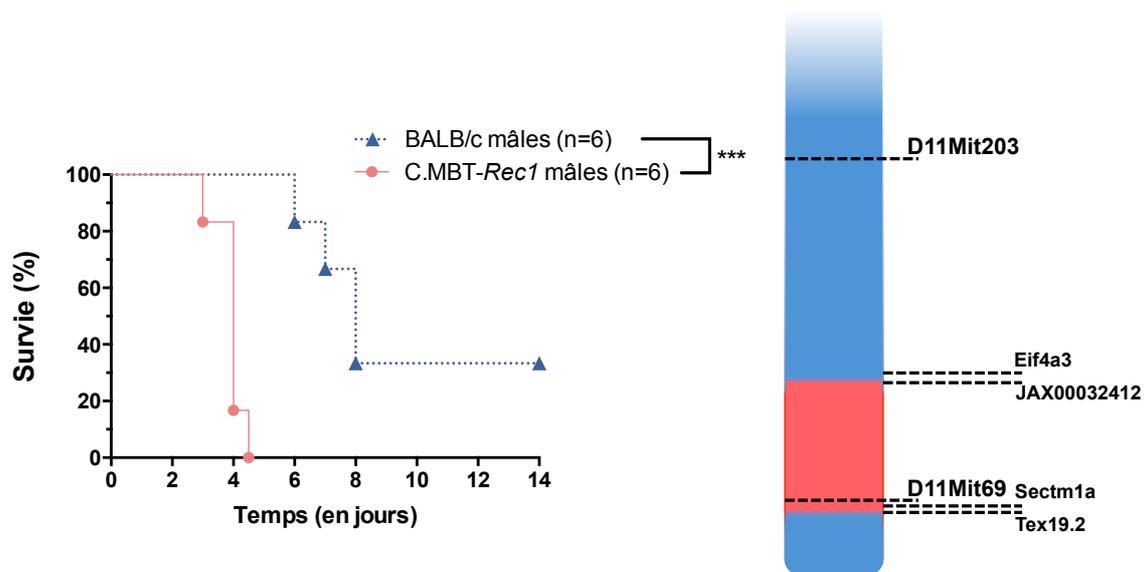


Figure 26 : Survie de la lignée sous-congénique C.MBT-*Rec1*

À gauche: Courbes de survie (Kaplan-Meier) en fonction du temps, en jours, après l'infection des mâles de la lignée sous-congénique C.MBT-*Rec1*. Le nombre d'animaux par génotype est indiqué à l'intérieur des parenthèses. Test du log-rank, ***, $P < 0,001$.

À droite: Haplotype du segment sous-congénique *Rec1* délimité par les gènes *Eif4a3* et *Tex19.2*. La position du segment d'origine MBT (en rouge) est indiquée sur le fonds génétique BALB/c (en bleu).

« [Coryphée :] *Quel remède as-tu trouvé (...) Qu'espères-tu ? (...) Comment ? (...) cherche quelque moyen de te délivrer (...)* »²³

LA RECHERCHE DE GÈNES CANDIDATS

Une fois l'intervalle *Ryfs2* réduit à moins d'une centaine de gènes, nous avons effectué une comparaison des exomes des deux souches parentales BALB/c et MBT. La mise en place d'une approche bioinformatique à haut débit a été jugée pertinente pour permettre non seulement une comparaison des intervalles, mais aussi une analyse fonctionnelle des variants identifiés et une hiérarchisation des gènes candidats.

Deux types majeurs de variants ont été recherchés et étudiés : i) les **variants de structure** qui affectent la séquence codante d'un gène donné et, par conséquent, la séquence de la protéine produite ; ii) les **variants de régulation** qui affectent l'expression d'un gène donné.

1 L'identification des variants de structure

La recherche de variants affectant les séquences codantes a été réalisée sur des données de séquençage de la totalité de l'exome – l'ensemble des régions du génome annotées en tant qu'exons – des souris BALB/c et MBT. La plateforme *Illumina Next-Generation Sequencing* a été choisie pour le séquençage de l'exome. Les étapes de séquençage de *paired-end reads*, l'assemblage des *reads* et l'alignement de l'exome ont été effectués au *Broad Institute* (Cambridge, USA) (**Figure 27**).

1.1 L'analyse bioinformatique des données de séquençage

L'alignement d'un exome de souris repose sur la comparaison des séquences des *reads* obtenues à celles du seul génome de souris dûment assemblé et annoté de nos jours, le génome de la lignée consanguine C57BL/6 (Mouse Genome Sequencing et al., 2002). C'est pourquoi le génome de cette lignée est utilisé en tant que génome de référence dans les études de génomique chez la Souris. Or, nous n'étudions pas la lignée de référence, mais la lignée de laboratoire BALB/c et la lignée sauvage MBT. Cette dernière est très éloignée génétiquement

²³ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 247-283

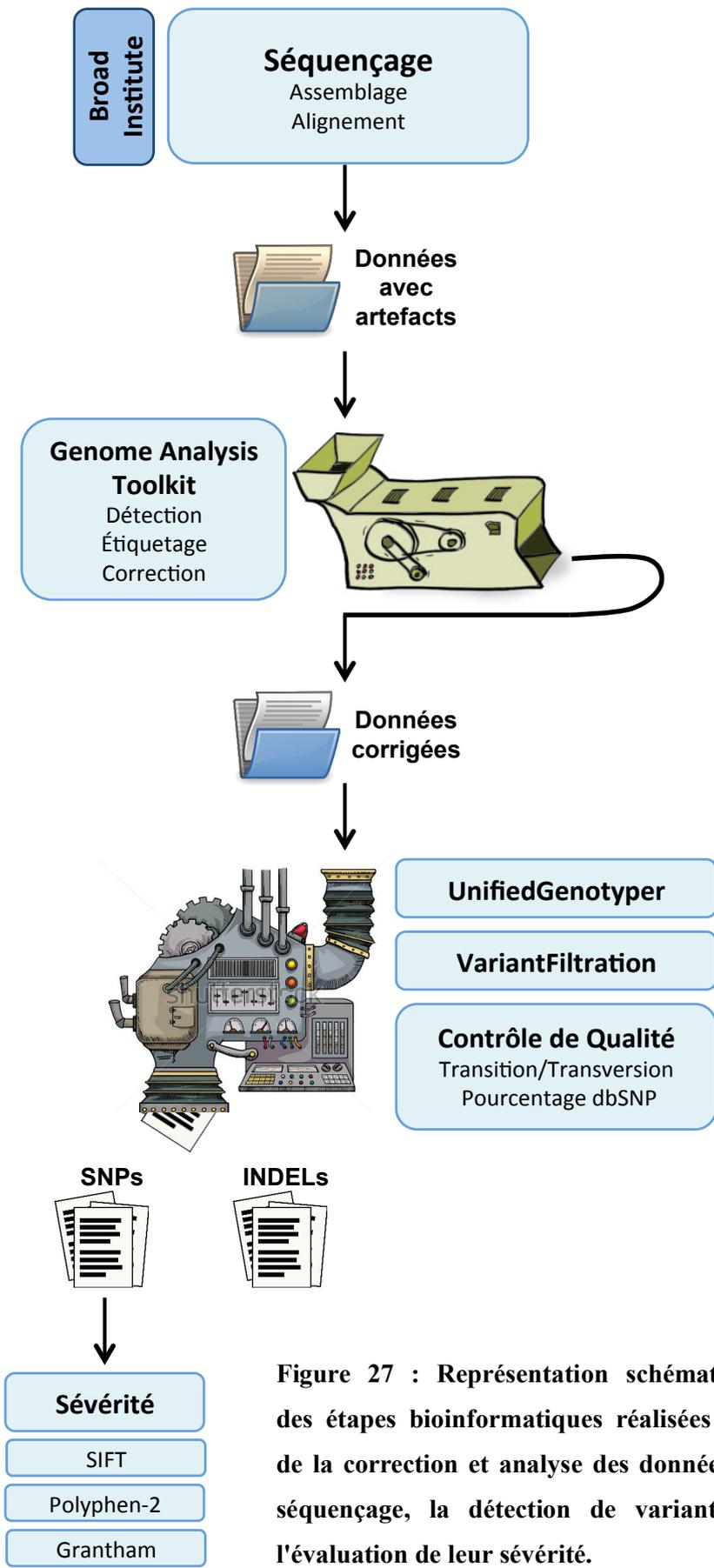


Figure 27 : Représentation schématique des étapes bioinformatiques réalisées lors de la correction et analyse des données de séquençage, la détection de variants et l'évaluation de leur sévérité.

de C57BL/6. Afin de comparer le exomes BALB/c et MBT, nous avons dû procéder à une comparaison indirecte en utilisant l'exome C57BL/6 comme intermédiaire. Nous avons identifié les variants entre chaque lignée d'intérêt et C57BL/6 avant de sélectionner ceux qui divergent entre BALB/c et MBT. Pour simplifier l'étude bioinformatique, seules les analyses des séquences du chromosome 11 ont été réalisées.

1.1.1 La correction des artefacts et des erreurs de séquençage

La distinction entre la variation biologique et les artefacts ou les erreurs de séquençage demeure le défi principal de l'analyse des données de séquençage de nouvelle génération. Afin de minimiser l'impact des artefacts associés au séquençage et aux algorithmes d'alignement, un affinement informatique des séquences a été exécuté. Lors de la correction des données, nous avons ciblé trois artefacts majeurs : i) les erreurs d'alignement autour des INDELS ; ii) la présence de *reads* dupliqués ; iii) les variations de la qualité des nucléotides selon leur position dans les *reads*. Les données de séquençage de MBT et BALB/c ont été filtrées et réorganisées à l'aide d'une librairie logicielle appelée GATK (pour *Genome Analysis Toolkit*) qui incorpore les différents algorithmes de détection, l'étiquetage, le réalignement local et la correction des artefacts ainsi que tous les tests de contrôle qualité des sorties (DePristo et al., 2011). Cette correction a été opérée de façon automatisée et à travers un flux de tâches (**Figure 27**) similaire à celui proposé sur le site de GATK pour l'analyse des exomes (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Les sorties corrigées et calibrées obtenues peuvent alors être analysées.

1.1.2 La détection de « variants bruts » : SNPs et INDELS

Deux types majeurs de variants ont été analysés lors de cette étude : les *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) et les *Insertions/Deletions* (INDELS). Dans le but de détecter les variants présents dans les exons BALB/c et MBT, les fichiers obtenus à la fin de l'étape d'affinement des séquences ont été comparés à la séquence consensus du génome de référence C57BL/6 et les couples de séquences ont été parcourus par le programme *UnifiedGenotyper* de GATK. *Unified Genotyper* a produit un fichier en format VCF qui contient les coordonnées génomiques de chaque variant détecté ainsi que les annotations de qualité et de génotype qui lui ont été affectées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**. Un total de 238 130 variants ont été identifiés sur l'ensemble des exons du chromosome 11 de la lignée BALB/c. Environ 92% correspondent à des SNPs et 8% à des INDELS. Une même

	INDELS	SNPs			Ti/Tv	Variants Totaux		
		Total	Connus	Nouveaux			dbSNP (%)	
MBT								
.....								
<i>UnifedGenotyper</i>	62.907	750.443	306.706	443.737	40,87	2,29	813.350	
<i>VariantFiltration</i>	Exclus	622	118.943	22.215	96.728	18,68	1,63	119.565
	Filtrés	62.285	631.500	284.491	347.009	45,05	2,45	693,785
BALB/c								
.....								
<i>UnifedGenotyper</i>	18.194	219.936	159.343	60.592	72,45	2,12	238.130	
<i>VariantFiltration</i>	Exclus	565	41.681	15.973	25.708	38,32	2,33	42.246
	Filtrés	17.629	178.255	143.370	34.885	80,43	3,33	195,884

Tableau 3 : Description des « variants bruts » détectés par *UnifedGenotyper* et des « variants filtrés » par *Variant Filtration*

proportion de SNPs/INDELs a été retrouvée sur les 813 350 variants identifiés dans l'exome de la lignée MBT. Cependant, les exons MBT contiennent 3,4 fois plus de variants que les exons BALB/c quand ils sont comparés au génome de référence C57BL/6.

1.1.3 Le filtrage des variants : exclusion de faux positifs

Un nombre important de faux positifs avait été précédemment relevé dans les séries de variants détectés par *UnifiedGenotyper*. Ces séries ont été nommées « variants bruts ». Pour réduire l'impact des faux positifs dans notre étude, nous avons procédé à une étape de filtrage des variants bruts à l'aide de l'outil informatique *VariantFiltration* de la librairie logicielle GATK. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3**. Cette procédure a conduit à diminuer d'environ 16% le nombre initial de SNPs et de 9% le nombre des INDELs identifiés dans l'exome MBT. Une proportion plus importante de faux positifs a été observée parmi les « variants bruts » de BALB/c (19% de SNPs et 3% de INDELs). Pourtant, le quotient SNPs/INDELs est le même pour les génotypes, BALB/c et MBT (91% de SNPs et 9% de INDELs). Au terme de l'analyse, 195 885 et 693 785 variants ont été identifiés sur le chromosome 11 des souris BALB/c et MBT, respectivement.

1.1.4 Les indicateurs de la qualité des « variants filtrés »

Pour s'assurer que le filtrage des faux positifs a amélioré la qualité de nos données, les données brutes et les données filtrées ont subi des contrôles qualité. Nous avons adapté à la Souris la démarche utilisée chez l'Homme pour le contrôle des données de séquençage. Les étapes de ce contrôle des données reposent sur l'analyse de deux indicateurs de la qualité des SNPs : le quotient du nombre de transitions – substitutions d'une purine (A ou G) par une purine ou d'une pyrimidine (T ou C) par une pyrimidine – par le nombre de transversions – substitutions d'une purine par une pyrimidine ou vice-versa – (Ti/Tv), d'une part, et le pourcentage de SNPs connus, c'est à dire de SNPs qui sont présents dans les bases de données en ligne, d'autre part.

▪ Le quotient de Transitions/Transversions

En ce qui concerne le premier indicateur, des études précédentes ont montré que chez les Vertébrés les transitions sont plus fréquentes que les transversions et que, chez l'Homme plus particulièrement, le nombre de transitions peut être égal au double du nombre de transversions (Zhang and Gerstein, 2003). Ce rapport est encore plus élevé dans les régions

codantes du génome humain où le quotient Ti/Tv est souvent de 3 (Freudenberg-Hua et al., 2003). Notre étude a permis de calculer des quotients Ti/Tv égaux à 2,12 et 2,29 sur les données brutes des exomes BALB/c et MBT, respectivement. Un enrichissement en transitions a été observé sur les données après le filtrage : 3,33 pour l'exome BALB/c et 2,45 pour l'exome MBT (**Tableau 3**). Ces résultats suggèrent que l'étape de filtrage permet d'améliorer la qualité des SNPs.

▪ **Le pourcentage de SNPs connus**

Nous avons également analysé l'évolution du pourcentage des SNPs connus. Pour ce faire, nous avons comparé les variants identifiés sur les deux lignées à ceux présents sur la base de données dbSNP (Sherry et al., 2001, NCBI Resource Coordinators, 2015) de l'Université de Californie, Santa Cruz (UCSC). Tandis que 72,45% des « variants bruts » de BALB/c et 40,87% des « variants bruts » de MBT étaient présents dans dbSNP, ces proportions ont augmenté de 8% et 4%, respectivement, sur les données filtrées (**Tableau 3**). Cela indique que les variants éliminés constituaient des groupes de substitutions non encore décrits chez la Souris et étaient probablement des faux positifs. Cependant, notre analyse a identifié 381 909 nouveaux SNPs pouvant impacter les régions codantes de BALB/c et MBT.

1.2 Des variants dans 28 gènes de l'intervalle congénique

Puisque notre objectif était d'identifier des variants ayant un effet sur des gènes impliqués dans la sensibilité des souris à l'infection par le VFVR, nous avons limité notre étude à l'intervalle génétique et physique qui distingue les souris C.MBT-*Rec1* sensibles des souris BALB/c résistantes. Nous avons vu précédemment que cet intervalle s'étend entre les positions 119,30 Mb et 121,12 Mb sur le chromosome 11. La liste des variants identifiés chez les lignées parentales MBT et BALB/c a donc été réduite aux variants compris entre ces deux positions génomiques. Nous avons également supposé que seules les substitutions ayant un impact sur la séquence en acides aminés peuvent contribuer à un phénotype de sensibilité (dans le cas où la mutation responsable de la sensibilité est une mutation exonique). C'est pourquoi les SNPs annotés comme « silencieux » - n'entraînant pas une substitution de l'acide aminé - ont été éliminés. Toutes les INDELS apportent des changements significatifs à la séquence en acides aminés. Elles n'ont donc pas été filtrées. Enfin, nous avons sélectionné les variants présents sur l'exome de la lignée sensible MBT qui ne sont pas présents dans la lignée résistante BALB/c. Cette sélection a produit une liste de 86 SNPs et 4 INDELS

localisés dans 28 gènes de la région *Rec1* portée par les souris C.MBT-*Rec1* sensibles. Aucun SNP ne produit de mutation « non-sens », la perte du codon d'initiation ou d'arrêt de la phase ouverte de lecture. Les 86 SNPs identifiés induisent des mutations « faux-sens » qui entraînent des substitutions d'acides aminés.

1.3 L'évaluation de la sévérité des variants de structure

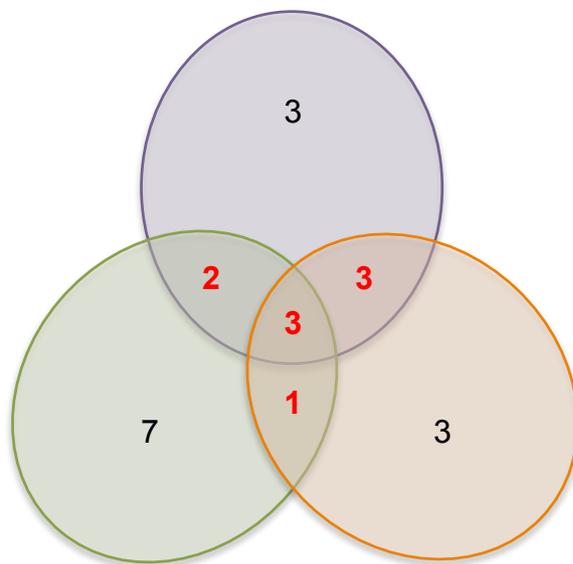
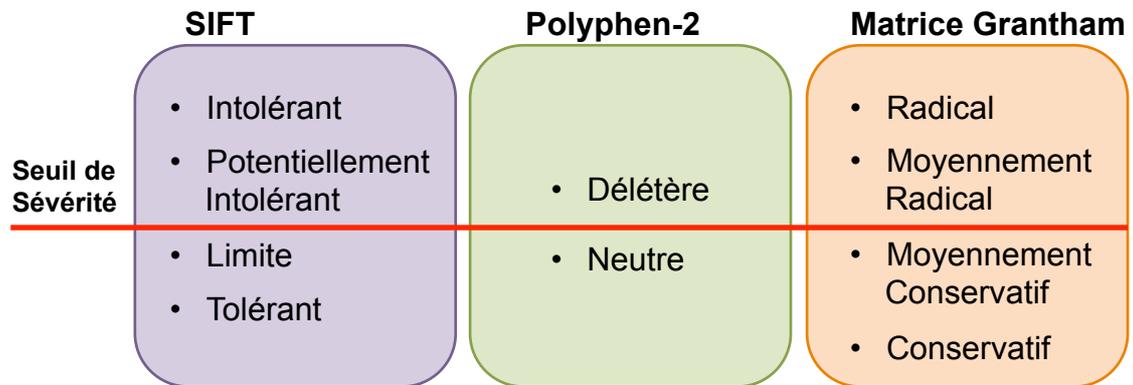
Les SNPs et les INDELS responsables de variations phénotypiques importantes pour l'organisme peuvent avoir des conséquences très variées au niveau de la protéine. Selon leur position dans la protéine ou les propriétés biochimiques des acides aminés, les variants peuvent provoquer une modification de la structure, de la stabilité, voire de l'activité enzymatique et des interactions de la protéine atteinte. Il n'est donc pas surprenant que des substitutions « faux-sens » différentes affectent les protéines avec différents degrés de sévérité.

1.3.1 La sévérité prédite des SNPs

Afin d'évaluer la sévérité de l'impact de chacune des 86 substitutions sur la protéine et ainsi d'établir une hiérarchie parmi les gènes candidats à la sensibilité à la FVR, nous avons caractérisé chaque mutation à l'aide de trois outils : i) le logiciel *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) (Kumar et al., 2009) ; ii) le logiciel *Polymorphism Phenotyping v2* (Polyphen-2) (Adzhubei et al., 2013) ; iii) la matrice des distances chimiques de Grantham (Grantham, 1974).

▪ Les logiciels SIFT et Polyphen-2

Les deux premières stratégies (SIFT et Polyphen-2) reposent sur le fait que la sélection naturelle exerce une pression sélective sur les domaines critiques pour la fonction des protéines de telle sorte qu'ils sont conservés au cours de l'Evolution. Par conséquent, des acides aminés hautement conservés à travers les différentes protéines orthologues connues sont estimés intolérants à un changement. Leur substitution, lorsqu'elle a lieu, est supposée sévère. Tandis que SIFT tient compte des propriétés chimiques des acides aminés substitués, Polyphen-2 privilégie les données de fonction et de structure 3D de la protéine. Le logiciel SIFT a classé les 86 SNPs dans 4 catégories (**Figure 28A**) de sévérité croissante : deux catégories de faible sévérité : Tolérant (63 SNPs), et *Borderline/Limite* (11 SNPs) et deux



Gènes affectés
Rnf213
EndoV
Enthd2
Tspan10
Stra13
Dcxr
Fasn
Cd7

Figure 28 : Évaluation de la sévérité des SNPs

- A) Les SNPs faux-sens identifiés dans les régions codantes de l'intervalle congénique ont été classés dans différentes catégories de sévérité selon l'outil de prédiction. Un seuil de sévérité a été établi, au dessus duquel un SNP est prédit délétère par l'outil.
- B) Diagramme de Venn qui montre la superposition des SNPs prédits délétères par chaque outil. Un SNP a été nommé délétère pour la protéine seulement s'il a franchi le seuil de sévérité avec deux des trois outils (les numéros en rouge).
- C) Les gènes affectés par les SNPs prédits délétères par au moins deux outils sont présentés.

catégories ayant une sévérité significative : Potentiellement Intolérant (2 SNPs), et Intolérant (9 SNPs). Polyphen-2 a prédit 13 SNPs ayant un effet délétère et 2 SNPs ayant un effet neutre. Les 71 SNPs restants n'ont pas été classés par le logiciel.

La matrice de distances chimiques de Grantham

La matrice de Grantham qui affecte une distance chimique à chaque paire d'acides aminés a été établie en prenant en considération trois propriétés physico-chimiques majeures des acides aminés : leur composition, leur polarité et leur volume moléculaire. Les distances chimiques de la matrice (D) varient sur une échelle de 0 (paire formée par un même acide aminé) à 215 (distance entre la Cystéine et le Tryptophane). Nous avons établi un seuil de sévérité de 100 ($D=100$). Quand $D>100$, nous considérons que la différence chimique entre les deux acides aminés est suffisamment grande pour avoir des conséquences sévères sur la structure de la protéine (Grantham, 1974). Les SNPs ont été divisés en 4 classes (**Figure 28A**) : Conservatifs ($D\leq 50$, 30 SNPs), Moyennement Conservatifs ($51\leq D\leq 100$, 45 SNPs), Moyennement Radicaux ($101\leq D\leq 150$, 6 SNPs), Radicaux ($D\geq 151$, 4 SNPs).

Les prédictions de sévérité combinées

Des études précédentes ont rapporté un taux important de faux positifs lors des analyses de sévérité réalisées avec les logiciels SIFT et Polyphen-2. Afin d'améliorer la fidélité de nos annotations, nous avons décidé de nommer un SNP délétère pour la protéine si et seulement si ce SNP a franchi le seuil de sévérité avec deux des trois outils (SIFT, Polyphen-2 et/ou Grantham). Le diagramme de Venn présenté dans la **Figure 28B** illustre la superposition des résultats avec chacune des stratégies utilisées. Nous avons identifié 9 SNPs remplissant cette condition, parmi les 86 SNPs analysés.

1.3.2 La sévérité prédite des INDELS

L'évaluation de la sévérité des 4 INDELS présentes dans l'intervalle *Rec1* porté par les souris congénique C.MBT-*Rec1* a été réalisée manuellement en reconstruisant la séquence altérée de la protéine affectée. Nous avons observé que toutes les INDELS correspondent à une délétion dans un exon MBT, qui provoque la perte de 1 à 4 acides aminés dans des domaines qui n'ont pas de fonction spécifique. Pour cette raison, ces changements ne semblent pas avoir *a priori* des effets sévères et, par conséquent, les variants correspondants ne sont pas classés parmi les meilleurs candidats pour être responsables de la sensibilité.

Lignées	Classiques de laboratoire												Dérivées de progéniteurs sauvages			
	1295J/SvImJ	129555VE ^h rd	129P2/Ola	A/J	AKR/J	CBH/HeJ	CBA/J	DBA/2J	LP/J	NOD/ShiLl	NZO/ShiLl	WSB/EiJ	PWK/PhJ	CAST/EiJ	SPRET/EiJ	
SNPs chromosome 11	185,686	183,752	162,010	312,543	260,793	279,269	260,895	283,268	242,076	264,007	334,819	325,143	930,448	936,402	1,756,937	

Tableau 4 : Nombre total de SNPs détectés sur les régions codantes du chromosome 11 de 15 lignées de souris de laboratoire.

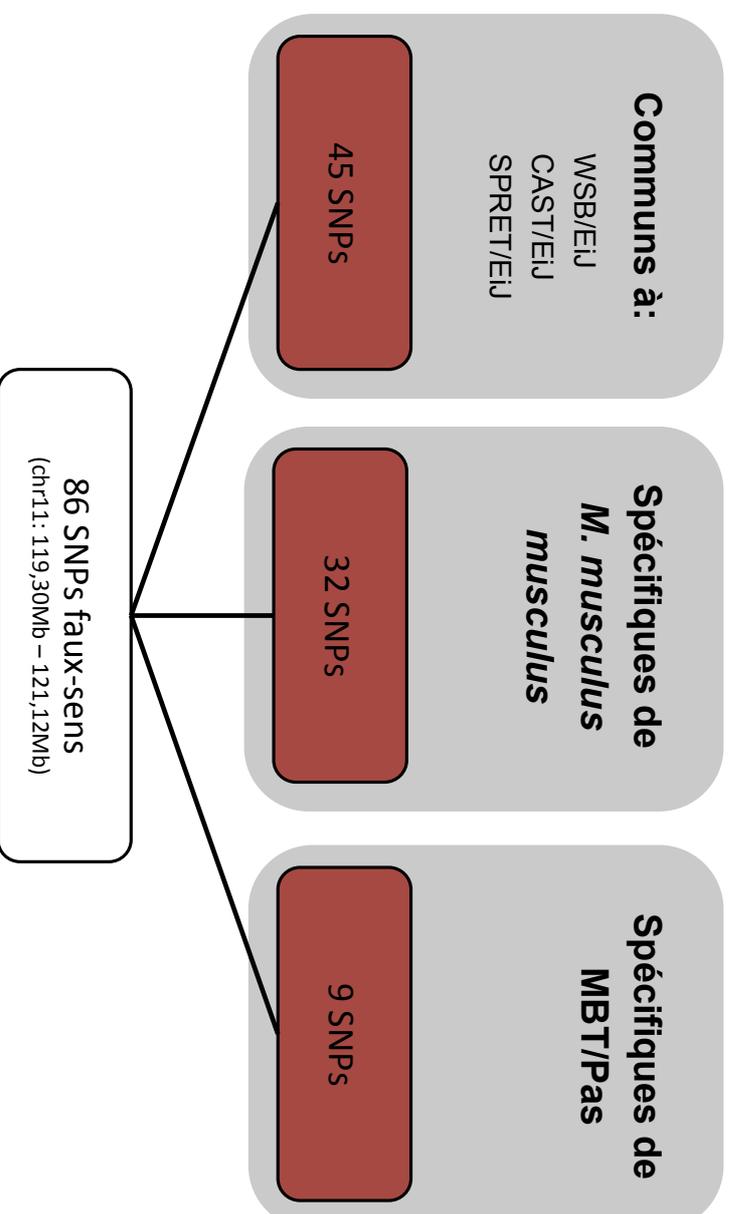


Figure 29 : Caractérisation sous-spécifique des SNPs faux-sens identifiés sur la région congénique d'origine MBT.

1.3.3 L'intervalle *Rec1* contient 9 SNPs délétères qui pourraient avoir un impact sur la fonction de 8 protéines

L'ensemble des analyses de la sévérité de l'impact des variants de MBT sur la séquence polypeptidique a révélé 9 SNPs de sévérité accrue capables de changer substantiellement les propriétés de 8 protéines (**Figure 28C**). Les gènes codant ces 8 protéines figurent en tête de la liste des gènes candidats : *Rnf213*, *EndoV*, *Enthd2*, *Tspan10*, *Stra13*, *Dcxr*, *Fasn* et *Cd7* (voir le **Tableau 6**).

1.4 L'étude comparée des SNPs identifiés dans différentes lignées consanguines de souris

Des tests de complémentation ont suggéré que deux lignées d'origine *Mus musculus musculus*, les lignées MBT et PWK/Pas, portent la même mutation à l'origine de la sensibilité précoce au VFVR. Cette information nous a conduit à mieux caractériser les SNPs présents sur le segment congénique dans le génome de la Souris.

1.4.1 La recherche de SNPs sur le génome de 15 lignées de souris

Nous avons tiré parti des séquences de génome entier de 15 lignées consanguines de souris utilisées d'ordinaire en laboratoire (Keane et al., 2011). Ces données sont disponibles sur le site du *Wellcome Trust Sanger Institute* (Hinxton, Grande-Bretagne, <http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes/>). Parmi les 15 lignées, figurent 11 lignées classiques de laboratoire (129S1/SvImJ, 129S5SvEv^{Brd}, 129P2/Ola, A/J, AKR/J, C3H/HeJ, CBA/J, DBA/2J, LP/J, NOD/ShiLtJ et NZO/HILtJ) et 4 lignées dérivées de progéniteurs sauvages (WSB/EiJ, PWK/PhJ, CAST/EiJ et SPRET/EiJ). Les 4 lignées sauvages représentent 4 taxons différents de l'arbre phylogénique du genre *Mus* : les sous-espèces *M. musculus musculus*, *M. musculus domesticus*, *M. musculus castaneus* et l'espèce *M. spretus*. Afin de pouvoir comparer les SNPs dans les différentes lignées, les différentes étapes d'identification de variants entre le génome d'une lignée et le génome de référence C57BL/6 ont été répétées pour chacune des lignées. Le **Tableau 4** présente le nombre de SNPs identifiés sur le chromosome 11 des 15 lignées. Malgré quelques variations observées dans le nombre absolu de SNPs des lignées classiques de laboratoire, chacune a en moyenne 250 000 variants par rapport à la lignée C57BL/6, qui est aussi une lignée classique de laboratoire. Un nombre comparable de SNPs a été identifié dans le génome de WSB/EiJ, une

lignée dérivée de la sous-espèce *M. m. domesticus* dont font partie les 11 lignées classiques. D'autre part, les lignées sauvages CAST/EiJ (*M. m. castaneus*) et PWK/PhJ (*M. m. musculus*) contiennent 930 448 et 936 402 SNPs, respectivement, soit trois fois plus de SNPs que les précédentes. Enfin, deux fois plus de SNPs (1 736 937) ont été découverts sur le chromosome 11 de la lignée SPRET/EiJ, dérivée d'une espèce différente du genre *Mus*, *M. spretus*. Il est à noter que nous avons détecté un nombre de SNPs chez PWK/PhJ comparable à celui de MBT. Les mêmes conclusions s'appliquent à la totalité de SNPs détectés dans les lignées classiques de laboratoire et, en particulier, dans la lignée BALB/c. Ces résultats sont en accord avec l'arbre phylogénique actuel du genre *Mus*.

1.4.2 Neuf SNPs dans l'exome de MBT seulement ne sont pas communs à PWK/PhJ

L'identification des SNPs des 15 lignées nous a permis de comparer chaque SNP détecté sur le segment *Rec1* et de déterminer son origine. Nous étions plus particulièrement intéressés par les SNPs communs à PWK/PhJ et MBT. Les résultats indiquent que, parmi les 86 SNPs présents dans l'intervalle *Rec1*, 45 sont communs à PWK/PhJ, MBT et à au moins une troisième lignée sauvage. Trente-deux SNPs sont présents de façon exclusive dans les génomes MBT et PWK/PhJ. Neuf SNPs ne sont présents que dans le génome MBT (**Figure 29**). Tous les SNPs ayant des effets prédits comme délétères sont communs aux génomes PWK/PhJ et MBT.

2 L'identification de variants de régulation

Les analyses d'exome ne permettent pas d'identifier les variants jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes lors de la transcription ou sur la stabilité des ARN messagers. Bien que parmi les SNPs identifiés certains puissent avoir une fonction régulatrice, les données de séquençage d'exome ne nous permettent pas de l'évaluer. C'est pourquoi, afin d'identifier des différences au niveau de la régulation génique, nous avons analysé des données transcriptomiques produites par la technique d'hybridation de l'ADN complémentaire (ADNc) sur une puce à ADN (*microarrays*).

2.1 Des études transcriptomiques identifient 10 gènes comme différentiellement exprimés au cours d'une infection par le VFVR

Précédent ce travail, deux analyses transcriptomiques ont été réalisées au sein du laboratoire. La première étude, réalisée par Tania Zaverrucha Do Valle (2010), a comparé les profils d'expression de cultures primaires de fibroblastes obtenus à partir d'embryons BALB/c ou MBT au jour 13,5 de la gestation (MEFs) et infectés par le VFVR. Les ARNs totaux ont été extraits des deux populations cellulaires 9 heures après l'infection avec le virus et les ADNc correspondants ont été hybridés sur une puce à ADN représentative du génome de souris (Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0).

Gènes	Expression Différentielle (FM>2)	
	Fibroblastes Embryonnaires	Macrophages
Rnf213	●	●
Nptx1	●	○
Baiap2	○	●
Ccdc137	●	○
Slc25a10	○	●
Sirt7	●	●
Rac3	○	●
Cbr2	○	●
Dus1l		●
Csnk1d	○	●

Tableau 5 : Gènes de la région congénique exprimés différentiellement après l'infection.

Les gènes différentiellement exprimés dans les conditions testées (MEFs ou macrophages) sont indiqués (cercle rouge). Les cercles blancs signalent les gènes dont l'expression ne varie pas dans une condition donnée.

Tableau 6 : Liste des gènes candidats et leurs variants
(Inc = Inconnu)

Gènes	Variant Structure	Variant Délétère	Variant Régulation	Variant commun PWK/PhJ
Rnf213	SNP/INDEL	x	x	Oui
EndoV	SNP	x		Oui
Enthd2	SNP	x		Oui
Tspan10	SNP	x		Oui
Stra13	SNP	x		Oui
Dcxr	SNP	x		Oui
Fasn	SNP	x		Oui
Cd7	SNP	x		Oui
Slc25a10	SNP/INDEL		x	Oui
Baiap2	SNP		x	Oui
Dus1l	SNP		x	Oui
Nptx1			x	Inc
Ccdc137			x	Inc
Sirt7			x	Inc
Rac3			x	Inc
Cbr2			x	Inc
Csnk1d			x	Inc
Sgsh	SNP			Oui
Slc26a11	SNP			Oui
Aatk	INDEL			Inc
Azi1	SNP			Oui
Slc38a10	SNP			Oui
Bahcc1	SNP			Oui
2310003H01Rik	SNP			Oui
1810049H13Rik	SNP			Oui
Arl16	SNP			Oui
Hgs	SNP			Oui
Pcyt2	SNP			Oui
Pycr1	SNP			Oui
Aspscr1	SNP			Oui
Lrrc45	SNP			Oui
Rfng	SNP			Oui
Ccdc57	SNP			Oui
Sectm1a	SNP			Oui

La deuxième expérience a été menée par Satoko Tokuda sur des cultures primaires de macrophages isolés du péritoine de souris adultes BALB/c ou C.MBT-*Ryfs2* et infectés par le VFVR. Les ARNs totaux ont été extraits 6 heures après l'infection et les ADNc ont été hybridés sur le même type de puce à ADN. La même procédure a été réalisée sur des cultures cellulaires non-infectées utilisées comme contrôles pour les deux études décrites. Les données brutes des expériences ont été corrigées, normalisées et transformées en \log_2 , de sorte que les résultats sont exprimés sous forme de facteur multiplicatif. Les variations d'expression d'un même gène entre génotypes différents et au sein du même génotype avant et après l'infection ont été étudiées par une approche bioinformatique. Nous avons utilisé comme seuil de significativité un facteur multiplicatif de 2. Le **Tableau 5** présente la liste des dix gènes différentiellement exprimés dans au moins une des conditions et cartographiés dans l'intervalle *Rec1*. Le gène *Rnf213*, qui porte deux mutations prédites comme étant délétères, figure parmi les 10 gènes différentiellement exprimés.

3 Les gènes candidats

L'ensemble des analyses génomiques et transcriptomiques réalisées nous a permis de proposer une liste de 34 gènes candidats localisés sur le segment *Rec1* (**Tableau 6**).

Parmi les 34 gènes candidats :

- a) Vingt-huit gènes portent une mutation qui change la séquence d'acides aminés de la protéine codée par les génomes BALB/c et MBT;
- b) Neuf de ces mutations ont été prédites comme délétères pour la fonction ou la structure des protéines ;
- c) Trois gènes contiennent 1 ou 2 INDELS impactant la séquence polypeptidique de leurs produits;
- d) Dix gènes sont différentiellement exprimés dans des cultures primaires de macrophages et/ou de fibroblastes embryonnaires de souris infectés par le VFVR.

Classement <i>PosMed</i>				
<i>Virus</i>		Place	<i>Liver</i>	
Gène	Variant		Gène	Variant
Fasn	Oui	1	Fasn	Oui
P4hb	Non	2	Gcgr	Non
Cd7	Oui	3	P4hb	Non
Actg1	Non	4	Cd7	Oui
Fscn2	Non	5	Fscn2	Non
Sectm1b	Non	6	Rptor	Non
Rac3	Oui	7	Alyref	Non
Sgsh	Oui	8	Slc26a11	Oui
Chmp6	Non	9	Baiap2	Oui
Mafg	Non	10	Nptx1	Oui

Tableau 7 : Liste des 10 gènes de la région congénique les plus fortement associés aux mots-clés « virus » et « liver ».

Les gènes en rouge font partie de la liste de gènes candidats du Tableau 6.

4 Les gènes *Fasn* et *Cd7* sont associés aux mots-clés « virus » et « liver »

En dernier lieu, nous avons voulu compléter la caractérisation des gènes candidats en combinant nos données expérimentales avec les données bibliographiques. Cette démarche a été simplifiée par l'usage de l'outil informatique *Positional Medline (PosMed)* du *RIKEN Mouse Bioresource* (Yoshida et al., 2009). Cet outil, disponible en ligne (<http://omicspace.riken.jp/>), établit une association entre un groupe de gènes dans un intervalle donné, un mot-clé saisi par l'expérimentateur et les publications scientifiques qui contiennent un des gènes et le mot-clé choisi. L'association est exprimée par une valeur P attribuée à chaque gène de l'intervalle. Pour cette étude, nous avons indiqué les positions délimitant l'intervalle congénique et deux mots-clés : 'virus' et 'liver'. **Le Tableau 7** montre les 10 gènes les plus fortement associés à chacun des mots-clés. Sur un total de 20 gènes, 7 sont parmi les 36 gènes candidats que nous avons établis. Il est particulièrement remarquable que deux gènes soient communs aux deux classements et occupent les premières positions, *Fasn* et *Cd7*. Les deux gènes portent des SNPs dont les effets sont prédits comme délétères pour la protéine correspondante.

REFUTATIO

OU

DISCUSSION

*« Tous les trois jours, ah ! funeste pensée,
Dans un sinistre envol le serviteur de Jupiter
Vient me déchirer de ses serres crochues
Et fait de moi, sauvagement, sa pâture.
Après s'être longtemps nourri et repu de mon foie,
Rassasié, il pousse un cri épouvantable
Et il reprend son vol vers le ciel »²⁴*

²⁴ Extrait du *Prométhée délivré* d'Eschyle in *II^e Tusculanes* de Cicéron.

« [Coryphée :] *Sachons d'abord quel est son mal ; tu lui apprendras ensuite les épreuves qui l'attendent encore* »²⁵

LA SENSIBILITÉ DES SOURIS À LA FVR EST UN CARACTÈRE COMPLEXE ET POLYGÉNIQUE

De nos jours, plus de 5 000 variants causant des maladies monogéniques différentes ont été découverts dans le génome de l'Homme (Chen et al., 2013). Dans la plupart des cas, ces découvertes ont révolutionné le diagnostic et ont abouti au développement de nouveaux traitements pour les maladies comme la fibrose kystique (Kerem et al., 1989, Riordan et al., 1989, Rommens et al., 1989), l'hémophilie ou certaines formes de cancer (Ginsburg, 2011). En revanche, l'étude des caractères polygéniques n'a pas bénéficié d'un tel avancement et seulement un petit pourcentage d'études portant sur un caractère complexe ont conduit à l'identification des variants génétiques associés (Lu et al., 2014, Manolio et al., 2009, DiPetrillo et al., 2005, Chakravarti et al., 2013). Pourtant ce sont les caractères complexes qui contribuent majoritairement à la variation phénotypique des Mammifères et à leurs maladies.

La réponse de l'hôte à l'infection par un agent pathogène comme le VFVR est en elle-même un phénomène hautement complexe. Le degré de complexité est notamment dû au tropisme très large présenté par le virus et au nombre de mécanismes cellulaires, immunitaires, et physiologiques qui doivent être dûment coordonnés afin de combattre avec efficacité une infection systémique (Vidal et al., 2008). La mise en œuvre d'une réponse coordonnée implique la régulation très fine de la communication entre différents types cellulaires, de plusieurs voies de signalisation et de l'interaction d'un grand nombre de protéines ayant des fonctions très variées. Puisque ces stratégies sont majoritairement contrôlées au niveau génétique, il n'est pas étonnant qu'un grand nombre de gènes aient un effet sur la réponse à l'infection (Rose and Bell, 2012).

1 L'étude de cartographie de QTLs

Afin de détecter des régions du génome contenant des gènes associés à la différence de sensibilité entre les souris MBT et BALB/c, nous avons réalisé une étude de cartographie

²⁵ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 629-675

de QTL sur une population F2 dérivée du croisement des deux lignées. Cette approche quantitative nous a permis d'identifier deux régions sur les chromosomes 2 et 11, significativement associées à une différence de sensibilité au VFVR et une troisième région sur le chromosome 5 dont l'association n'était que suggestive. Nous avons nommé les trois régions, respectivement, *Rift Valley fever susceptibility locus (Rvfs) 1*, 2 et 3. La nomenclature utilisée correspond à l'ordre décroissant des logarithmes de probabilité (LOD score) maximales - mesurant l'association entre le génotype et le phénotype - sous un modèle non-paramétrique. Ainsi, à *Rvfs1* correspond un LOD score de 4,58, à *Rvfs2* de 2,99 et à *Rvfs3* de 2,95. Les modèles statistiques utilisés ont suggéré un effet additif entre les trois QTLs qui, ensemble, expliquent seulement 8,3 % de la variabilité phénotypique observée entre les deux souris.

1.1 L'épistasie

L'absence d'interaction épistatique entre les locus et, par conséquent, entre les gènes correspondants est plutôt étonnante pour un caractère qui affecte la réponse des individus à une infection. Comme mentionné précédemment, une réponse immunitaire pour être efficace doit être finement régulée, ce qui implique une intersection de plusieurs cascades de signalisation et une interaction entre les gènes et leurs modificateurs (Rose and Bell, 2012). Cette hypothèse est confortée par plusieurs études qui ont identifié des locus associés à la réponse immunitaire de la Souris à différents pathogènes – le virus Sendai (Simon et al., 2009), le nématode *Trichuris muris* (Hayes et al., 2014) ou le parasite *Plasmodium yoelii* (Pattaradilokrat et al., 2014) – qui présentent de fortes interactions épistatiques. Nos résultats suggèrent que les gènes identifiés présents aux locus agissent de manière indépendante, et que les mécanismes affectés ont des fonctions physiologiques différentes les uns des autres.

1.2 La variance phénotypique

Le pourcentage de la variance phénotypique expliquée par des QTLs identifiés lors d'études de caractères complexes est très variable. Il dépend essentiellement de la spécificité du phénotype observé, de l'hétérogénéité de locus (qui reflète le nombre de gènes différents ayant un effet sur un caractère) et du nombre d'individus analysés (Eichler et al., 2010, Manolio et al., 2009, McClellan and King, 2010, Zuk et al., 2012, Buchner and Nadeau, 2015). Les études d'association (*Genome-wide association studies, GWAS*) suivantes

illustrent bien cette variabilité. L'une a analysé le risque de dégénération maculaire associée à l'âge chez 2 172 individus (Maller et al., 2006). Elle a permis la découverte de 5 QTLs qui expliquent 50% de la variance. Trois autres études (Gudbjartsson et al., 2008, Lettre et al., 2008, Weedon et al., 2008) qui, ensemble, impliquaient 63 000 individus ont identifié 40 QTLs associés à la taille de l'Homme et expliquaient 5% de la variance. Une estimation statistique a révélé qu'il faudrait analyser la taille de 253 288 individus afin d'identifier 697 QTLs qui expliqueraient un pourcentage de variance génétique similaire à celui de la dégénération maculaire (Wood et al., 2014). Tout comme la taille, le phénotype de mort ou de survie d'animaux infectés que nous avons étudié lors de la cartographie de QTL est le phénotype le plus global, le plus intégré, qui soit en terme de réponse de l'hôte à un pathogène. Une hétérogénéité de locus importante est donc attendue. Nous pouvons conclure que le phénotype de survie après une infection par le VFVR est contrôlé par un grand nombre de gènes dont les effets sont faibles ou modérés et qui n'ont pas pu être détectés avec le nombre de F2 utilisés dans cette analyse.

2 La difficulté d'identifier des facteurs génétiques

2.1 La résolution des QTLs

L'obstacle majeur de la cartographie QTL reste de réduire la région critique à si peu de gènes candidats qu'ils puissent être testés fonctionnellement de façon individuelle. La résolution moyenne d'un QTL détecté par des croisements en deux générations est d'environ 20 cM (DiPetrillo et al., 2005, Buchner and Nadeau, 2015); un tel intervalle comprend généralement plusieurs centaines de gènes. Parmi les trois QTLs identifiés dans cette étude, seul *Rvfs2* possède une taille de 20,3 cM. *Rvfs1* s'étend sur environ 30 cM et *Rvfs3* sur 64,39 cM. L'estimation du nombre de gènes contenus dans les intervalles *Rvfs2*, *Rvfs1* et *Rvfs3* est de 600, 800 et 1 900, respectivement. Ces données illustrent bien le degré de complexité de l'analyse et la difficulté de disséquer des QTLs.

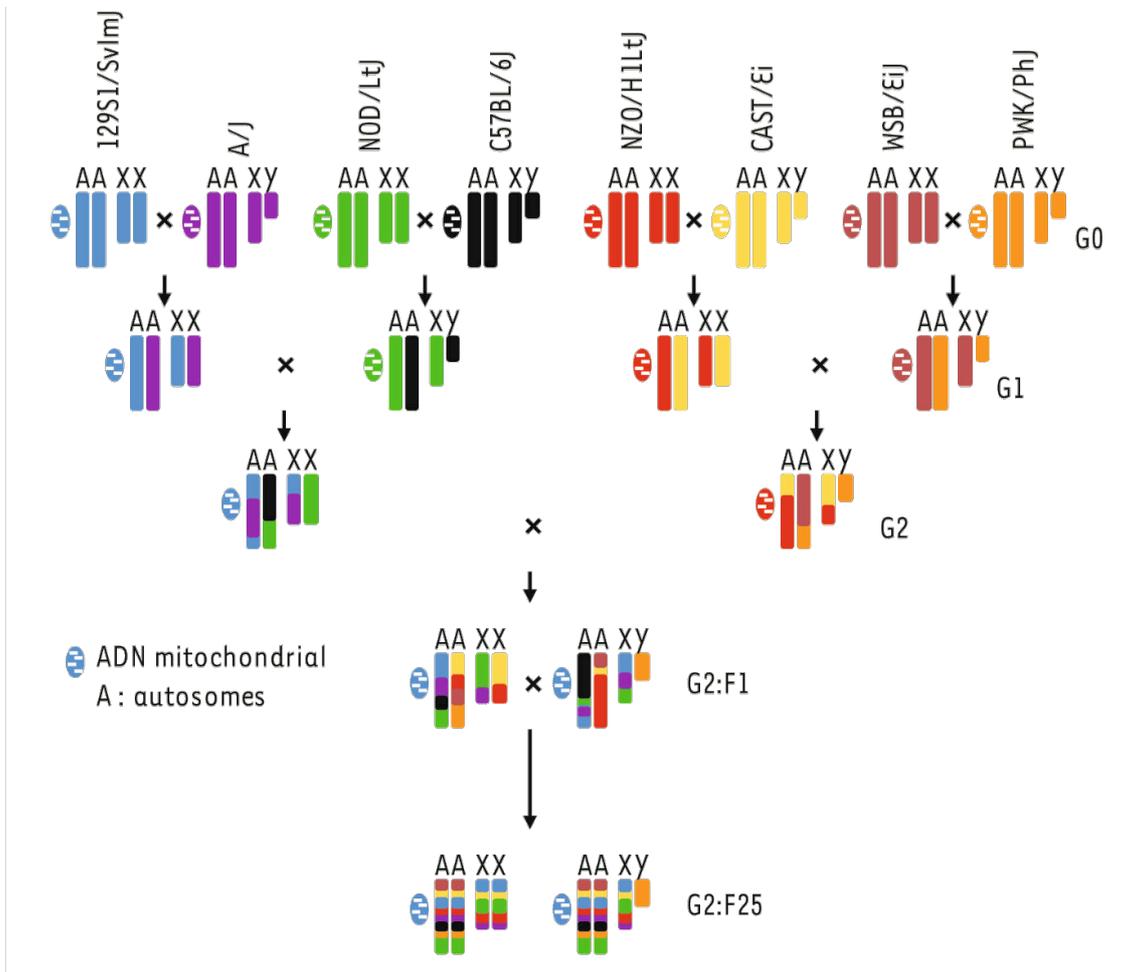


Figure 30: Schéma de croisement ayant conduit aux lignées du CC.

Les croisements réalisés en première génération déterminent l'origine parentale des chromosomes X et Y et de l'ADN mitochondrial dans la lignée produite.

(Panthier and Montgutelli, 2012)

2.1.1 Les nouveaux outils génétiques: *Collaborative Cross* et *Diversity Outbred*

À l'heure actuelle, l'établissement de nouvelles populations génétiques de référence, comme le *Collaborative Cross* (CC) et le *Diversity Outbred* (DO), permet d'obtenir une résolution de cartographie bien supérieure à celles observées dans les études de populations F2 (Collaborative Cross, 2012, Panthier and Montagutelli, 2012, Svenson et al., 2012, Gatti et al., 2014). Le CC est une population constituée de plus de 300 lignées recombinantes consanguines issues de huit lignées différentes de laboratoire (**Figure 30**) – cinq lignées classiques de laboratoire (A/J, C57BL/6J, 129S1/SvImJ, NOD/ShiLtJ, NZO/H1LtJ) et trois lignées dérivées de souris sauvages (PWK/PhJ, WSB/EiJ, CAST/EiJ) – qui ont été croisées de sorte que chaque lignée parentale est représentée à part égale (12,5%) dans l'ensemble des lignées du CC (Panthier and Montagutelli, 2012). Le DO a été obtenu par le croisement randomisé de 144 lignées du CC et, contrairement à la population du CC, est maintenu à l'état non-consanguin (Svenson et al., 2012). Les travaux menés par Rashida Lathan dans notre laboratoire sur la sensibilité de quelques dizaines de lignées du CC à la FVR permettront de détecter de nouveaux QTLs à haute résolution et ainsi identifier de nouveaux gènes de la sensibilité à la FVR chez la Souris.

2.2 Les autres obstacles

Outre la résolution de la cartographie, d'autres facteurs ralentissent la découverte des facteurs génétiques sous-jacents aux QTLs :

a) L'effet faible du locus individuel sur le phénotype étudié

Une étude récente réalisée dans notre unité et portant sur la résistance à *Yersinia pestis*, l'agent de la peste, a montré que lorsqu'on introduit individuellement les trois QTLs de résistance (*Yprl1*, *Yprl2*, *Yprl3*) dans un fonds génétique sensible, le phénotype de survie observé chez la lignée parentale est perdu (Chevallier et al., 2013). Un seul QTL est donc insuffisant pour conférer une résistance aux souris et il est nécessaire d'associer deux QTLs dans la même lignée pour induire un phénotype de résistance partielle.

Lors de notre étude génétique sur la réponse de l'hôte à la FVR, nous avons transféré les régions correspondant aux intervalles de confiance de chaque QTL (*Rvfs1*, *Rvfs2*, *Rvfs3*) de la lignée sensible MBT dans un fonds résistant BALB/c et avons établi trois lignées

congéniques. Nonobstant les différences de survie détectées dans au moins un des sexes, le phénotype de sensibilité précoce a été perdu chez les lignées congéniques portant les locus *Rvfs1* (médiane de survie des mâles : 7 jours) et *Rvfs3* (médiane de survie des mâles : 6 jours). Seules les souris de la lignée C.MBT-*Rvfs2* présentaient une sensibilité précoce dans les deux sexes rappelant le phénotype de la lignée parentale MBT. Des études futures sur des lignées bi-congéniques pour *Rvfs1* et *Rvfs3* permettront de tester si l'effet cumulé de ces deux QTLs rétablit le phénotype de sensibilité précoce.

b) L'absence de sous-phénotypes pour caractériser l'effet d'un locus

Comme nous l'avons précisé ci-haut, la survie est un phénotype global et direct, mais c'est aussi le phénotype le plus complexe et le plus intégré qui puisse être étudié au cours d'une infection. La complexité du phénotype est un résultat du grand nombre de gènes potentiellement impliqués dans la mort d'un organisme. La réduction de la survie à des sous-phénotypes quantitatifs permettrait non seulement l'identification d'autres locus à effet faible, mais aussi une évaluation plus approfondie de l'effet individuel des locus *Rvfs1* et *Rvfs3*.

Le travail réalisé par le groupe d'Edward Wakeland et Laurence Morel sur le lupus érythémateux disséminé est un bon exemple de l'utilisation des sous-phénotypes pour caractériser la contribution de chaque locus à la maladie. Alors que seulement une lignée congénique a développé le phénotype global de glomérulonéphrite lupique, toutes les autres lignées ont présenté des sous-phénotypes immunologiques (Morel et al., 1997, Morel et al., 1994). La production d'une lignée tri-congénique combinant les différents locus a reconstitué le phénotype de la lignée parentale (Morel et al., 2000).

Nous avons évalué des sous-phénotypes quantitatifs – le poids, la température, la virémie, le niveau sérique des transaminases, l'évolution des lésions histologiques et la capacité régénérative - chez la lignée congénique C.MBT-*Rvfs2* qui présente une sensibilité précoce. Bien que les caractères testés ne soient pas discriminants de la sensibilité précoce des souris C.MBT-*Rvfs2* et des souris résistantes BALB/c, ces études ont été très informatives sur l'évolution de la FVR dans les deux lignées, notamment l'initiation d'une prolifération importante des hépatocytes chez les souris BALB/c dans les 24h qui suivent la mort des souris congéniques, au 4^{ème} jour de l'infection. Ces résultats donnent des indications précieuses sur la fonction potentielle du gène responsable des différences de survie.

Perspectives

Tania Zaverucha do Vale avait relevé l'importance de l'immunité innée et en particulier de la réponse aux interférons α et β dans la sensibilité des souris MBT à la FVR. Des études approfondies sur la réponse immunitaire des souris MBT ont été poursuivies par Rashida Lathan qui, après avoir identifié une neutropénie chez la souris MBT infectée par la VFVR, teste actuellement l'importance des neutrophiles dans les tous premiers jours après l'infection. Ces résultats pourront aider à l'identification de sous-phénotypes et clarifier les effets des locus *Rvfs1* et *Rvfs3*.

c) La complexité du QTL

De nombreuses dissections génétiques de QTLs ont montré que le LOD score élevé associé à un locus résulte parfois de l'action combinée de plusieurs gènes étroitement liés (Morel et al., 2001, Bihl et al., 1999, Sancho-Shimizu et al., 2007, Ahn et al., 2010). Cela pourrait être le cas pour le locus *Rvfs3* sur le chromosome 5 qui présente un grand intervalle critique comprenant plusieurs pics sur la courbe des LOD score. D'autres auteurs ont mis en évidence la présence de gènes à effet modéré qui n'avaient pas été détectés lors de la cartographie QTL en raison de leur liaison génétique à un gène majeur. Le phénotype de sensibilité tardive observé uniquement chez les femelles de la lignée sous-congénique C.MBT-[*D11Mit14-D11Mit181*] illustre parfaitement cette situation. La séparation du gène majeur qui confère la sensibilité précoce dans les deux sexes et qui est porté par les lignées sous-congéniques C.MBT-[*D11Mit203-D11Mit69*] et C.MBT-[*D11Mit69*], a dévoilé l'effet d'un gène en position proximale et ayant un effet plus tardif. Comme le phénotype n'a pas été affaibli chez les lignées sous-congéniques portant un fragment plus distal, les deux locus ne semblent pas agir de façon concertée.

*« Il fit alors surgir un aigle aux ailes ouvertes,
qui dévorait son foie immortel : ce que le rapace
lui avait dévoré le jour repoussait la nuit même »²⁶*

LE LOCUS *RVFS2* CONTRÔLE UNE TOLÉRANCE À L'INFECTION PAR LE VFVR

Janelle Ayres et David Schneider (2012) ont décrit la réponse de l'hôte aux pathogènes envahisseurs à travers la « métaphore du château ». Selon eux, un organisme vertébré est une forteresse qui durant un siège ou une invasion doit, certes, être défendue par la classe guerrière afin d'éliminer l'ennemi, mais il appartient aussi aux habitants de réparer les dégâts, de distribuer des aliments, de s'occuper des enfants ou des vieux et, quand cela est judicieux, de combattre les hordes ennemies.

1 Les mécanismes de réponse aux infections

Ils résumant ainsi les deux types de mécanismes que chaque organisme a à sa disposition pour répondre à une infection (Ayres and Schneider, 2012). L'un, très bien étudié, peut être défini par la capacité d'un organisme à limiter la réplication et la dissémination du pathogène, amenant à son élimination. Il est nommé « Résistance ». L'autre, encore obscur dans les domaines de l'immunologie, est décrit comme la capacité de l'organisme à endurer la réplication et la dissémination du pathogène, en limitant les dégâts qu'il peut causer au système. Il est nommé « Tolérance ».

Aux mécanismes de résistance appartiennent toutes les voies canoniques de l'immunité : la réponse inflammatoire, la reconnaissance du pathogène, le complément, la phagocytose, les anticorps, la production de ROS, etc. Les mécanismes de tolérance sont moins bien connus et ils comptent des mécanismes de contrôle du niveau de la réponse immunitaire, de non-réponse volontaire ou passive, de protection contre les lésions, de réparation, de manipulation du comportement du pathogène, de redistribution d'énergie, etc (Ayres and Schneider, 2012).

²⁶ Hésiode, *La Théogonie*, 523-525

2 La tolérance

Le concept de tolérance a été utilisé pour la première fois par des botanistes qui décrivaient les mécanismes des moissons pour garder leur vigueur même lorsque fustigés par des herbivores (Kover and Schaal, 2002, Schwachtje et al., 2006). La tolérance était alors associée au *fitness* de la plante, mesuré par leur capacité reproductive (Tiffin and Rausher, 1999).

2.1 La tolérance dans l'immunité des Mammifères

Les premières descriptions de tolérance chez les vertébrés ont été décrites par Lars Raberg (2007) lors de ses études sur l'infection de différentes lignées de souris par le parasite *Plasmodium chabaudi*. Il a utilisé le poids corporel et la numération des globules rouges dans le sang des souris comme indicateurs de la santé physique (ou *fitness*) qu'il a confronté à la charge du pathogène, la parasitémie. Ces études ont montré que des lignées différentes de souris présentant des niveaux de parasitémie similaires avaient des degrés de sévérité de la maladie très différents (Raberg et al., 2007). Il a ainsi défini la tolérance comme la capacité à limiter la sévérité de la maladie. Nous verrons que cette définition est réductrice et n'inclut pas tous les cas de figure.

D'autres travaux ont décrit le mécanisme de contrôle des lésions provoquées par la migration de l'helminthe *Nippostrongylus brasiliensis* à travers le poumon des souris (Hoeve et al., 2009, Reece et al., 2006). La migration des larves, qui provoque des hémorragies graves et une anémie, induisait chez l'hôte l'expression de gènes importants pour la réparation des tissus pulmonaires (l'élastine, le pro-collagène).

2.2 La tolérance à la FVR

Quoique la majorité des études de tolérance chez les Vertébrés s'adresse aux infections parasitaires (Reece et al., 2006, Raberg et al., 2007, Jeney et al., 2014), il n'y a aucune raison pour que ce concept ne soit pas appliqué aux infections bactériennes ou virales.

Dans notre étude, nous avons mesuré la charge du VFVR dans le sang et le foie chez les deux lignées de souris d'intérêt, BALB/c et C.MBT-*Ryfs2*. Simultanément, nous avons

évalué la mortalité des souris, leur état général de santé et les lésions hépatiques. Chacun de ces paramètres peut être utilisé en tant que mesure de *fitness* de l'hôte.

Nos résultats ont montré de façon très claire qu'il n'y a pas de différence dans le taux de réplication et de dissémination du virus entre les deux lignées de souris puisque la charge virale était la même dans le sang et dans le foie des animaux des deux génotypes. Quant aux paramètres de santé physique, tous, à l'exception de la mortalité, étaient équivalents entre les souris analysées. Les deux groupes présentaient la même perte de poids, la même variation de température et de transaminases sériques, les mêmes profils de lésions hépatiques aux 3^{ème} et 4^{ème} jours après l'infection et donc le même degré de sévérité. Bien qu'on ne puisse pas nier l'apport qualitatif de ces paramètres à l'étude de la maladie, ils ne peuvent pas être considérés comme informatifs pour discriminer les effets d'une résistance ou d'une tolérance. En revanche, la différence très significative de mortalité observée entre les deux lignées de souris, malgré leurs charges virales équivalentes, est indicatrice de l'action de mécanismes de tolérance chez les souris BALB/c qui vivent plus longtemps (**Figure 31**).

2.1.2 Le mécanisme de réparation

Nous nous sommes ensuite intéressés à la nature du mécanisme qui confère cette tolérance aux souris BALB/c. Nous avons montré par une étude d'immunohistochimie que les souris BALB/c initient un processus de prolifération cellulaire massive qui est très développé au jour 6 après l'infection et qui est caractérisé par un nombre important de cellules en mitose et une désorganisation de la structure géométrique du parenchyme hépatique.

Des résultats récents d'expression montrent que la transcription du gène codant la protéine régulatrice du cycle cellulaire, la cycline B1, caractéristique de la phase mitotique de la cellule, est activée dans le foie des souris BALB/c dès le jour 4 après l'infection. Les niveaux d'ARNm cycline B1 dans le foie des souris congéniques restent inférieurs et invariables. Nos résultats suggèrent qu'une prolifération des hépatocytes des souris BALB/c existe déjà à ce stade.

L'ensemble des résultats de pathophysiologie et expression génique suggère que les souris BALB/c et C.MBT-*Rvfs2* permettent au virus de se répliquer et de disséminer de la même façon chez l'individu infecté, il en résulte un même profil lésionnel et une même

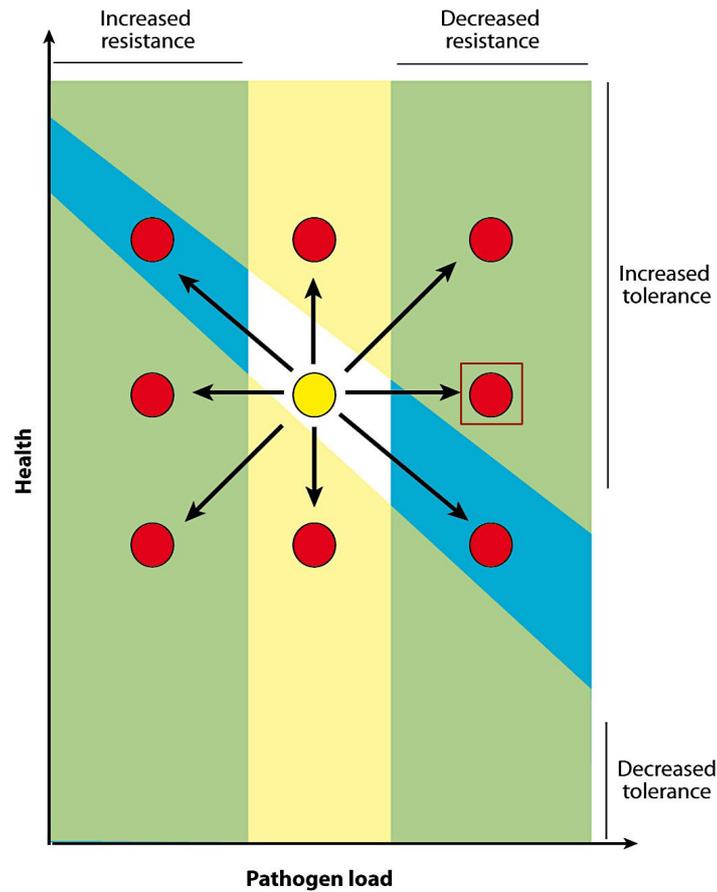


Figure 31 : Les cas de figure possibles selon les différents rapports entre la santé (ou *fitness*) de l'hôte et la charge du pathogène.

La figure montre comment la modification des propriétés d'un individu peut se traduire dans des changements de résistance et tolérance dans le système.

Le cercle jaune marque la position initiale. Le changement des propriétés de l'hôte ou de l'environnement peut conduire à l'un des 8 mouvements vers les cercles rouges. Un mouvement vers le bas ou vers le haut (espace jaune) indique un changement de la tolérance au pathogène. Le mouvement au long de la diagonale (en bleu) correspond à un changement de la résistance. Tous les autres mouvements possibles requièrent des changements contraires de la résistance et de la tolérance.

Le carré rouge indique le mouvement observé chez les souris BALB/c infectées avec le VFVR lorsqu'on considère la mortalité comme indicateur de la fitness des souris.

D'après Ayres and Schneider, 2012

maladie. Cependant les souris BALB/c ont une meilleure capacité à régénérer un tissu hépatique sain, ce qui leur permettrait de survivre plus fréquemment à cette forme de la FVR.

3 Tolérance vs. Résistance

Quoique différentes, la résistance et la tolérance ne sont pas exclusives. Au contraire, elles sont souvent complémentaires. La clairance partielle ou complète du virus observée dans le sang des souris BALB/c illustre parfaitement la coordination des deux mécanismes lorsque la tolérance permet à ces souris de gagner du temps afin de monter une réponse immunitaire, et donc une résistance efficace qui réussisse à éliminer le virus. Les souris C.MBT-*Ryfs2* semblent être affectées dans la tolérance et elles meurent avant même de pouvoir monter une réponse immunitaire efficace.

« [Prométhée :] *Mais comment et par quelle voie s'accomplira-t-il (...)* »²⁷

FASN EST LE MEILLEUR GÈNE CANDIDAT POUR LA SENSIBILITÉ AU VFVR

Nous avons terminé la partie des Résultats en bâtissant une hiérarchie des gènes candidats présents dans l'intervalle de la lignée sous-congénique C.MBT-*Rec1*.

1 La liste de gènes candidats

Deux conditions ont déterminé l'inclusion des gènes dans la liste :

Soit la présence d'un SNP prédit comme ayant des effets délétères, commun à la lignée sauvage PWK

Le test de complémentation que nous avons réalisé entre MBT et PWK suggère que la mutation causale de la sensibilité est présente dans les deux génotypes.

Afin de détecter les SNPs communs aux deux lignées sauvages de *M. musculus musculus*, nous avons fait une comparaison de leurs séquences génomiques. Nous avons trouvé que tous les SNPs prédits comme délétères dans notre approche sont partagés entre elles.

Mais !

Ces conclusions doivent pourtant être prises avec précaution car deux lignées différentes, PWK/Pas et PWK/PhJ, ont été utilisées pour le test de complémentation et la comparaison de séquences, respectivement.

Le choix que nous avons fait est lié à des raisons pratiques : un grand nombre de souris de la lignée PWK/Pas, élevées à l'Institut Pasteur de Paris, étaient facilement disponibles pour effectuer le test de complémentation fonctionnel, tandis que la lignée PWK/PhJ, qui est entretenue au *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Etats-Unis) mais pas à l'Institut Pasteur, avait été choisie pour que son génome soit entièrement séquencé (Keane et

²⁷ Eschyle, *Prométhée enchaîné*, 859-897

al., 2011) de même que celui de 18 lignées de souris (*Wellcome Trust Sanger Institute*, Hinxton, Royaume-Uni).

La divergence de PWK/Pas et PWK/PhJ

Les deux lignées PWK/Pas et PWK/PhJ ont été dérivées du même couple de progéniteurs *M. m. musculus* capturés dans les environs de Prague il y a plus de 30 ans. Dès lors, la lignée PWK a été divisée en deux colonies, l'une a été établie à Paris, l'autre à Bar Harbor. Elles ont divergé durant les 3 dernières décennies.

Dans le but d'estimer la divergence des lignées PWK/Pas et PWK/PhJ, nous avons comparé les données de génotypage obtenues en utilisant la plateforme MUGA. Environ 10% des SNPs testés sont différents sur l'ensemble des locus testés au long du génome. Seulement neuf SNPs sont localisés dans la région congénique dont l'un est polymorphe entre PWK/Pas et PWK/PhJ. Ce résultat confirme une divergence estimée de 10% entre les deux lignées.

Nous concluons qu'une validation chez PWK/Pas des SNPs candidats pour la sensibilité de MBT sera nécessaire avant de se lancer dans des expériences de mutagenèse ciblée.

Soit une expression différentielle après l'infection

Les données de transcriptomique utilisées pour la sélection des gènes candidats proviennent d'expériences réalisées sur des macrophages péritonéaux et des fibroblastes embryonnaires de souris infectés. Bien que les deux systèmes cellulaires aient été validés par de nombreux travaux sur l'étude de la réponse immunitaire innée (do Valle et al., 2010, Aguilo et al., 2014, Sharma et al., 2014, Gomet et al., 2011, Demeure et al., 2012, Ponnusamy and Clinkenbeard, 2012), nos résultats sur les souris C.MBT-*Ryfs2* indiquent un rôle prépondérant des hépatocytes dans l'issue de la maladie. Nous souhaitons valider les données d'expression dans un modèle *in vivo* pertinent, et pour cette raison nous étudions la cinétique d'expression des gènes candidats dans le foie de souris C.MBT-*Ryfs2* et BALB/c infectées en utilisant la méthode de RT-PCR quantitative.

2 Les gènes candidats

Avec l'information que nous possédons à ce stade, trois gènes apparaissent comme les meilleurs gènes candidats : *Rnf213*, *Cd7* et *Fasn*.

2.1 *Rnf213*

Le gène *Rnf213*, *Ring finger protein 213*, a été ainsi nommé parce que la protéine correspondante porte un domaine doigt de zinc. Si la fonction moléculaire de la protéine n'a pas encore été clarifiée, la structure prédite indique un rôle potentiel dans des mécanismes de médiation d'interactions entre protéines (Borden, 1998, Schule and Evans, 1991, Struhl, 1989).

2.1.2 Les études publiées

Des études d'association génétique, ont établi une liaison entre des variants de *Rnf213* dans les populations humaines et le risque de développer la maladie de Moya Moya (Miyawaki et al., 2013, Fujimura et al., 2014, Kamada et al., 2011). Cette affection, rare en Occident, est caractérisée par le rétrécissement progressif des artères situées à la base du crâne, ce qui empêche le flux normal de sang vers le cerveau. Pour compenser le ralentissement de la circulation sanguine, des petits vaisseaux secondaires se développent dans la région crânienne des patients (Suzuki and Takaku, 1969, Scott and Smith, 2009). Des travaux complémentaires chez le poisson-zèbre ont montré que l'inhibition de l'expression de *Rnf213* induit un développement aberrant des vaisseaux de la tête (Liu et al., 2011). Enfin, la base de données d'expression Gene Atlas (<http://biogps.org/>) indique une expression augmentée dans les macrophages activés par l'exposition au LPS bactérien.

2.1.3 Nos données expérimentales

Rnf213 est le premier gène de notre classement puisque l'allèle d'origine MBT porte 15 mutations faux-sens, dont 2 prédites comme délétères, et 2 délétions dans sa région codante. De plus, nos études ont détecté une activation de son expression dans les macrophages péritonéaux infectés *ex vivo*. Cependant, le même niveau d'activation a été observé chez les souris congéniques C.MBT-*Rvfs2* et les souris BALB/c. Contrairement aux

autres deux gènes candidats, l'outil Web PosMed (<http://omicspace.riken.jp>) ne trouve pas d'association entre *Rnf213* et les mots-clés « liver » ou « virus ».

2.1.4 Conclusion

D'après ces informations, *Rnf213* ne semble pas jouer un rôle majeur dans la différence de tolérance des lignées de souris étudiées, C.MBT-*Ryfs2* et BALB/c. Toutefois, de nouvelles précisions sur la fonction de la protéine pourraient modifier notre conclusion.

2.2 *Cd7*

Contrairement à *Rnf213*, *Cd7* est un gène très bien connu, et la protéine qu'il code, *Cluster of Differentiation 7*, est très étudiée. Le gène, découvert dans les années 80 (Aruffo and Seed, 1987), code une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines exprimée à la surface des thymocytes, des lymphocytes T matures et des cellules NK (Stillwell and Bierer, 2001). La protéine est aussi présente lors des phases précoces du développement de la lignée myéloïde (Hou et al., 1996). Plus particulièrement, CD7 possède une activité co-stimulatrice des lymphocytes T et une activité kinase capable d'activer la protéine transductrice, phosphatidyl inositol 3-kinase dans le cytoplasme de ces cellules (Chan et al., 1997, Stillwell and Bierer, 2001).

2.2.1 Nos données expérimentales

En ce qui concerne notre étude, l'allèle d'origine MBT de *Cd7* contient 3 mutations faux-sens dont une prédite comme délétère. Aucune évidence d'expression différentielle après infection de macrophages péritonéaux ou de fibroblastes embryonnaires de souris n'a pas été trouvée. Naturellement, PosMed détecte une forte association entre *Cd7* et le mot-clé « virus ». Cependant, l'association détectée entre le gène et le mot-clé « liver » n'a pas pu être vérifiée dans la bibliographie.

2.2.2 Conclusion

Vu son rôle majeur dans l'activation de la réponse immune à médiation cellulaire qui démarre tardivement sur des souris naïves et l'absence de liaison avec les mécanismes physiologiques qui se déroulent dans le foie, *Cd7* ne peut pas occuper la position première de la liste de gènes candidats.

2.3 *Fasn*

Le gène *Fasn* code une enzyme centrale de la synthèse des acides gras saturés chez tous les eucaryotes, l'acide gras synthétase (FASN, *Fatty acid synthase*). Cette protéine à structure multienzymatique agit comme un homodimère, elle catalyse l'ensemble des réactions qui convertissent le substrat malonyl-CoA en acide palmitique (**Figure 32, haut**) (Leibundgut et al., 2008). Pour ce faire, la protéine FASN possède 8 domaines enzymatiques (**Figure 32, bas**) – thioestérase, protéine porteuse d'acyle, malonyltransférase, synthase, deux réductases et deux déshydratases - chacun avec son propre site catalytique (Leibundgut et al., 2008), permettant une séquence de réactions unidirectionnelle et efficace dans une même localisation cellulaire. De plus, FASN contient deux domaines non catalytiques – pseudo-ketoréductase et pseudo-méthyltransférase – qui forment le cœur de la protéine et sont responsables de l'interaction entre deux monomères et, par conséquent, de la structure fonctionnelle en dimère (Maier et al., 2006, Chirala et al., 2001). Pour toutes ces caractéristiques biochimiques, FASN est une des enzymes du métabolisme des Mammifères les plus complexes ; elle est classée parmi les mégasynthétases (Leibundgut et al., 2008).

2.3.1 Les études publiées

Chez les Mammifères, l'activité enzymatique de FASN est essentiellement détectée dans le tissu hépatique, adipeux et dans les glandes mammaires qui sont tous les trois les organes majeurs de production et d'accumulation des acides gras dans l'organisme. Grâce à sa fonction centrale dans le métabolisme cellulaire, la protéine FASN a été impliquée dans une large gamme de phénomènes physiologiques. Parmi les nombreuses fonctions de la protéine, nous soulignons son implication dans la réplication des virus à ARN à l'intérieur des cellules des Mammifères (Heaton et al., 2010, Martin-Acebes et al., 2011, Yang et al., 2008, Heaton and Randall, 2011, Oem et al., 2008, Joven et al., 2011), dans les mécanismes de survie cellulaire, dans la prolifération des hépatocytes et la régénération du tissu hépatique (Asins et al., 1994, Gove and Hems, 1978) et sa fonction d'oncogène lors du développement des cancers du foie et du colon (Flavin et al., 2010, Murata et al., 2010).

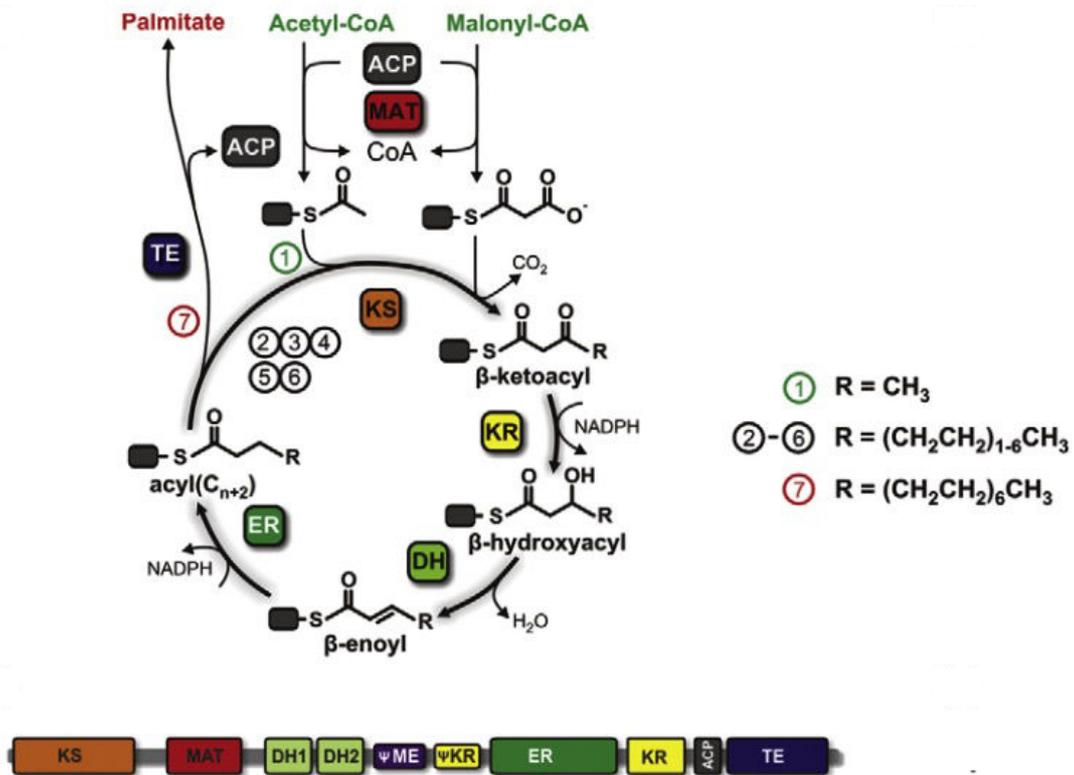


Figure 32 : La multi-enzyme acide gras synthétase (FASN) des Mammifères.

En haut – Le cycle de réactions de l’enzyme FASN. Les substrats (malonyl-CoA et acetyl-coA) sont pris en charge par la protéine porteuse d’acyle (ACP, gris) qui conduit les produits intermédiaires au long du cycle jusqu’à la libération de l’acide palmitique. Les activités catalytiques variées sont assurées par les différents domaines de la protéine

En bas – L’organisation linéaire des domaines de FASN à une échelle approximative de la séquence d’acides aminés. Les domaines catalytiques (colorés; MAT, malonyltransférase; KS, kétoacyl synthétase; KR, kétoacyl-réductase, DH déshydratase, ER, énoyl-réductase, TE, thioestérase) et de support (gris) sont indiqués. Les domaines non catalytiques, pseudo-KR (Ψ KR) et pseudo-méthyltransférase (Ψ ME) sont colorés en jaune et violet, respectivement.

D’après Leibundgut et al., 2008

Plusieurs travaux ont démontré que des virus hépatotropes, comme le virus de l'hépatite C et le virus de la Dengue, induisent une surexpression du gène *Fasn* et recrutent le complexe protéique sur les sites de réplication virale afin d'assurer une synthèse d'acides gras optimale pour la production de virions (Heaton et al., 2010, Joven et al., 2011, Yang et al., 2008). Bien qu'une relation directe entre le VFVR et *Fasn* n'ait jamais été établie, une étude réalisée par Theresa Moser (2012) a montré que l'inhibition de la synthèse des acides gras par la voie de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans des fibroblastes embryonnaires de souris qui ont été infectés par la souche atténuée du VFVR, MP-12, provoque une réduction importante du titre viral. Les chercheurs ont conclu que la biosynthèse des acides gras est nécessaire à la réplication du VFVR (Moser et al., 2012).

2.3.2 Nos données expérimentales

L'analyse des séquences de MBT avait prédit deux mutations faux-sens dans le gène *Fasn* dont une était prédite comme ayant des effets sévères dans le domaine thioestérase. Des résultats récents de re-séquençage d'un fragment du gène ont permis de conclure que la mutation n'était qu'un artefact provoqué par un mauvais alignement local. Il ne reste donc qu'une seule mutation dans l'exon 23 du gène qui provoque le changement du résidu histidine en position 1285 en tyrosine. La mutation affecte la séquence du domaine pseudo-méthyltransférase qui est important pour la dimérisation de la protéine (Maier et al., 2006, Chirala et al., 2001). Si les outils de prédiction de sévérité n'ont pas identifié ce changement comme délétère, une analyse bioinformatique plus détaillée de la substitution a montré que l'histidine 1285 et les séquences qui l'entourent sont conservées dans la protéine humaine et qu'un résidu tyrosine à cette position peut être phosphorylé dans son groupe hydroxyle. Cela suggère une conservation importante de la région et un effet potentiellement dramatique du changement pour la structure et la fonction de la protéine.

De plus, nous avons comparé la conservation du résidu histidine 1285 parmi les 18 lignées de souris de laboratoire séquencées (Keane et al., 2011). Toutes les lignées, à l'exception de PWK/PhJ, contiennent une histidine en position 1285. Le séquençage de la région de la mutation chez PWK/Pas a montré que la mutation y est aussi présente. Plus récemment, nous avons pu élargir notre étude à une autre lignée dérivée de souris sauvages *M. m. musculus* capturées en Danemark, nommée Skive/EiJ (Skive). La mutation His1285Tyr est également présente chez la lignée Skive. Ces données indiquent que la mutation est une innovation apparue lors de l'évolution de la sous-espèce *M. m. musculus*.

2.3.3 Conclusion et perspectives

D'après les données fonctionnelles et de séquence susmentionnées, *Fasn* est notre meilleur gène candidat pour la sensibilité de C.MBT-*Rvfs2*. Des expériences de substitution du codon Histidine chez la souris BALB/c par un codon Tyrosine à l'aide de la technologie de CRISPR/Cas9 sont en cours afin de démontrer la causalité de la mutation dans le phénotype de sensibilité.

À ce stade, nous ne pouvons pas émettre d'hypothèse sur le mécanisme d'action de *Fasn* dans la sensibilité. Si celle-ci est confirmée chez des souris transgéniques pour *Fasn*, nous espérons que des études complémentaires aideront à clarifier son rôle lors de l'infection par le VFVR.

PERORATIO

OU

CONCLUSION

*« Sitôt que mon foie dévoré a réussi
À se régénérer, le voilà qui revient, avide,
Pour un autre festin monstrueux. »²⁸*

²⁸ Extrait du *Prométhée délivré* d'Eschyle in *II^e Tusculanes* de Cicéron.

Déjà dans l'Antiquité, les peuples reconnurent le caractère essentiel du foie pour la vie. La preuve en est que les Égyptiens le conservèrent dans les vases canopes afin que la vie dans l'au-delà fût assurée au défunt. Hippocrate, père de la médecine, y vit la source des deux humeurs, sang et bile jaune, dont le moindre déséquilibre résulterait en une maladie du corps. L'anatomiste Galien enchérit sur la pensée de ses ancêtres que le foie était le centre de la circulation sanguine et la rate responsable de sa purification.

L'intérêt porté sur les affections hépatiques chez l'homme antique n'est pas étonnant à la lumière des connaissances modernes des fonctions majeures du foie : rôle central dans le métabolisme, production des facteurs de coagulation, destruction de toxines, production d'albumine et angiotensine, entre autres.

Pour les anciens, même une divinité éprouvait de la souffrance lorsqu'atteinte d'un mal hépatique. C'est pourquoi Zeus condamna Prométhée, enchaîné, à présenter son côté droit à l'aigle du Caucase pour qu'il se repût de l'organe tous les trois jours. Or, les grecs constatèrent aussi une particularité du foie face aux organes restants du corps : sa capacité régénérative. C'est d'ailleurs ainsi que le foie de Prométhée se renouvela pendant la nuit seulement pour devenir un nouveau repas le lendemain.

Tel l'aigle qui attaqua le foie de Prométhée, le virus de la fièvre de la Vallée du Rift infecte et détruit en trois jours celui des souris. Tout comme Prométhée, les souris de la lignée BALB/c semblent être sauvées par les propriétés régénératives du foie. Ainsi, plus qu'un modèle d'étude de la FVR, le couple BALB/c : C.MBT-*Rvfs2* serait un modèle de tolérance aux lésions hépatiques provoquées par des virus hépatotropes, voire d'autres agents nuisibles. Cette hypothèse pourra être confirmée dans les mois prochains par l'infection de ces souris par d'autres virus causant des hépatites, comme le virus de la Dengue.

En outre, nous n'avons pas accompli dans leur totalité les objectifs fixés au démarrage du projet. Toutefois, bien que le gène causal ne soit pas encore démontré, la stratégie que nous avons utilisée a permis un avancement considérable dans l'identification des facteurs génétiques impliqués dans la FVR. Nous avons notamment établi une liste de gènes candidats dont l'un est particulièrement prometteur, le gène *Fasn*. La démonstration de l'implication de *Fasn* dans le phénotype étudié établirait pour la première fois un lien direct entre le métabolisme des lipides, l'infection virale et la prolifération des hépatocytes.

Enfin, nous espérons que la découverte imminente du gène de *Rvfs2* et, par conséquent, des voies de tolérance à la FVR puisse contribuer au développement de nouvelles stratégies de soin médical et de nouveaux traitements.

La FVR continuera à être une maladie négligée par les décideurs et gouvernements tant qu'elle n'atteindra pas l'Occident. En qualité de scientifiques, il ne nous appartient pas de changer ces politiques, mais d'assurer que rien ne nous retient d'avancer nos connaissances de telle sorte que, le moment venu, nous en connaissons assez pour faire la différence.

C'est à ce moment là que la science dépasse le mythe.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-WAHAB, K. S., EL BAZ, L. M., EL-TAYEB, E. M., OMAR, H., OSSMAN, M. A. & YASIN, W. 1978. Rift Valley Fever virus infections in Egypt: Pathological and virological findings in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 72, 392-6.
- ADZHUBEI, I., JORDAN, D. M. & SUNYAEV, S. R. 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7, Unit7 20.
- AGUILO, N., URANGA, S., MARINOVA, D., MARTIN, C. & PARDO, J. 2014. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. *Cell Death Dis*, 5, e1343.
- AHMAD, K. 2000. More deaths from Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen. *Lancet*, 356, 1422.
- AHN, S. H., DESHMUKH, H., JOHNSON, N., COWELL, L. G., RUDE, T. H., SCOTT, W. K., NELSON, C. L., ZAAS, A. K., MARCHUK, D. A., KEUM, S., LAMLERTTHON, S., SHARMA-KUINKEL, B. K., SEMPOWSKI, G. D. & FOWLER, V. G., JR. 2010. Two genes on A/J chromosome 18 are associated with susceptibility to Staphylococcus aureus infection by combined microarray and QTL analyses. *PLoS Pathog*, 6, e1001088.
- AL-AFALEQ, A. I. & HUSSEIN, M. F. 2011. The status of Rift Valley fever in animals in Saudi Arabia: a mini review. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11, 1513-20.
- ALBAYRAK, H. & OZAN, E. 2012. The investigation of pestivirus and Rift Valley fever virus infections in aborted ruminant foetuses in the Blacksea region in Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 18, 457-461.
- ALRAJHI, A. A., AL-SEMARI, A. & AL-WATBAN, J. 2004. Rift Valley fever encephalitis. *Emerg Infect Dis*, 10, 554-5.
- ANDERSON, G. W., JR., SLONE, T. W., JR. & PETERS, C. J. 1987. Pathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) in inbred rats. *Microb Pathog*, 2, 283-93.
- ANDERSON, G. W., JR. & SMITH, J. F. 1987. Immunoelectron microscopy of Rift Valley fever viral morphogenesis in primary rat hepatocytes. *Virology*, 161, 91-100.
- ANSM. 2015. *Micro-organismes et toxines hautement pathogènes (MOT)* [Online]. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Available: [http://ansm.sante.fr/Dossiers/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Dossiers/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/Micro-organismes-et-toxines-hautement-pathogenes-MOT/(offset)/0) [Accessed 25 July 2015].
- ARUFFO, A. & SEED, B. 1987. Molecular cloning of two CD7 (T-cell leukemia antigen) cDNAs by a COS cell expression system. *EMBO J*, 6, 3313-6.
- ASINS, G., ROSA, J. L., SERRA, D., GIL-GOMEZ, G., AYTE, J., BARTRONS, R., TAULER, A. & HEGARDT, F. G. 1994. Gene expression of enzymes regulating ketogenesis and fatty acid metabolism in regenerating rat liver. *Biochem J*, 299 (Pt 1), 65-9.
- AYRES, J. S. & SCHNEIDER, D. S. 2012. Tolerance of infections. *Annu Rev Immunol*, 30, 271-94.
- BALENGHIEN, T., CARDINALE, E., CHEVALIER, V., ELISSA, N., FAILLOUX, A. B., JEAN JOSE NIPOMICHE, T. N., NICOLAS, G., RAKOTOHARINOME, V. M., ROGER, M. & ZUMBO, B. 2013. Towards a better understanding of Rift Valley fever epidemiology in the south-west of the Indian Ocean. *Vet Res*, 44, 78.
- BALKHY, H. H. & MEMISH, Z. A. 2003. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int J Antimicrob Agents*, 21, 153-7.
- BENFERHAT, R., JOSSE, T., ALBAUD, B., GENTIEN, D., MANSUROGLU, Z., MARCATO, V., SOUES, S., LE BONNIEC, B., BOULOY, M. & BONNEFOY, E. 2012. Large-scale chromatin immunoprecipitation with promoter sequence microarray analysis of

- the interaction of the NSs protein of Rift Valley fever virus with regulatory DNA regions of the host genome. *J Virol*, 86, 11333-44.
- BIHL, F., BRAHIC, M. & BUREAU, J. F. 1999. Two loci, Tmevp2 and Tmevp3, located on the telomeric region of chromosome 10, control the persistence of Theiler's virus in the central nervous system of mice. *Genetics*, 152, 385-92.
- BILLECOCQ, A., SPIEGEL, M., VIALAT, P., KOHL, A., WEBER, F., BOULOY, M. & HALLER, O. 2004. NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J Virol*, 78, 9798-806.
- BIRD, B. H., KHRISTOVA, M. L., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G. & NICHOL, S. T. 2007. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol*, 81, 2805-16.
- BIRD, B. H., KSIAZEK, T. G., NICHOL, S. T. & MACLACHLAN, N. J. 2009. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc*, 234, 883-93.
- BISHOP, D. H., CALISHER, C. H., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P., GAIDAMOVICH, S. Y., HANNOUN, C., LVOV, D. K., MARSHALL, I. D., OKER-BLOM, N., PETTERSSON, R. F., PORTERFIELD, J. S., RUSSELL, P. K., SHOPE, R. E. & WESTAWAY, E. G. 1980. Bunyaviridae. *Intervirology*, 14, 125-43.
- BLACKWELL, J. M., ROBERTS, C. W., ROACH, T. I. & ALEXANDER, J. 1994. Influence of macrophage resistance gene Lsh/Ity/Bcg (candidate Nramp) on *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Clin Exp Immunol*, 97, 107-12.
- BORDEN, K. L. 1998. RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem Cell Biol*, 76, 351-8.
- BOULOY, M., JANZEN, C., VIALAT, P., KHUN, H., PAVLOVIC, J., HUERRE, M. & HALLER, O. 2001. Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J Virol*, 75, 1371-7.
- BOULOY, M., PARDIGON, N., VIALAT, P., GERBAUD, S. & GIRARD, M. 1990. Characterization of the 5' and 3' ends of viral messenger RNAs isolated from BHK21 cells infected with Germiston virus (Bunyavirus). *Virology*, 175, 50-8.
- BOULOY, M. & WEBER, F. 2010. Molecular biology of rift valley Fever virus. *Open Virol J*, 4, 8-14.
- BUCHNER, D. A. & NADEAU, J. H. 2015. Contrasting genetic architectures in different mouse reference populations used for studying complex traits. *Genome Res*, 25, 775-791.
- CAGNOLATI, V., TEMPPIA, S. & ABDI, A. M. 2006. Economic impact of Rift Valley fever on the Somali livestock industry and a novel surveillance approach in nomadic pastoral systems. *11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics Cairns, Australia*.
- CARLETON, M. D. & MUSSER, G. G. 2005. *Rodentia*, The Johns Hopkins University Press.
- CDC 2000a. Outbreak of Rift Valley fever-Saudi Arabia, August-October, 2000. *MMWR*. Centers for Disease Control.
- CDC 2000b. Outbreak of Rift Valley fever-Yemen, August-October, 2000. *MMWR*. Centers for Disease Control.
- CDC. 2014. *CDC and Texas Health Department Confirm First Ebola Case Diagnosed in the U.S.* [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/media/releases/2014/s930-ebola-confirmed-case.html> [Accessed 25 July 2015].
- CHAKRAVARTI, A., CLARK, A. G. & MOOTHA, V. K. 2013. Distilling pathophysiology from complex disease genetics. *Cell*, 155, 21-6.

- CHAN, A. S., MOBLEY, J. L., FIELDS, G. B. & SHIMIZU, Y. 1997. CD7-mediated regulation of integrin adhesiveness on human T cells involves tyrosine phosphorylation-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, 159, 934-42.
- CHEN, W. H., ZHAO, X. M., VAN NOORT, V. & BORK, P. 2013. Human monogenic disease genes have frequently functionally redundant paralogs. *PLoS Comput Biol*, 9, e1003073.
- CHEVALIER, V., DE LA ROCQUE, S., BALDET, T., VIAL, L. & ROGER, F. 2004a. Epidemiological processes involved in the emergence of vector-borne diseases: West Nile fever, Rift Valley fever, Japanese encephalitis and Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Rev Sci Tech*, 23, 535-55.
- CHEVALIER, V., MONDET, B., DIAITE, A., LANCELOT, R., FALL, A. G. & PONCON, N. 2004b. Exposure of sheep to mosquito bites: possible consequences for the transmission risk of Rift Valley Fever in Senegal. *Med Vet Entomol*, 18, 247-55.
- CHEVALIER, V., PEPIN, M., PLEE, L. & LANCELOT, R. 2010. Rift Valley fever--a threat for Europe? *Euro Surveill*, 15, 19506.
- CHEVALLIER, L., BLANCHET, C., JAUBERT, J., PACHULEC, E., DEMEURE, C., CARNIEL, E., PANTHIER, J. J. & MONTAGUTELLI, X. 2013. Resistance to plague of *Mus spretus* SEG/Pas mice requires the combined action of at least four genetic factors. *Genes Immun*, 14, 35-41.
- CHIRALA, S. S., JAYAKUMAR, A., GU, Z. W. & WAKIL, S. J. 2001. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3104-8.
- COETZER, J. A. 1977. The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs. *Onderstepoort J Vet Res*, 44, 205-11.
- COETZER, J. A. & BARNARD, B. J. 1977. Hydrops amnii in sheep associated with hydranencephaly and arthrogryposis with wesselsbron disease and rift valley fever viruses as aetiological agents. *Onderstepoort J Vet Res*, 44, 119-26.
- COLLABORATIVE CROSS, C. 2012. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics*, 190, 389-401.
- CUÉNOT, L. 1902. La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez la souris. *Archive de zoologie expérimentale et générale*.
- DAUBNEY, R., HUDSON, J. R. & GARNHAM, P. C. 1931. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever: an undescribed disease of sheep, cattle and man from east Africa. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 89, 545-579.
- DAUBNEY R., H. J. R., GARNHAM P.C. 1931. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever: an undescribed disease of sheep, cattle and man from east Africa. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 89, 545-579.
- DAVIES, F. G. 2006. Risk of a rift valley fever epidemic at the haj in Mecca, Saudi Arabia. *Rev Sci Tech*, 25, 137-47.
- DAVIES, F. G. 2010. The historical and recent impact of Rift Valley fever in Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 83, 73-4.
- DAVIES, F. G. & HIGHTON, R. B. 1980. Possible vectors of Rift Valley fever in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74, 815-6.
- DAVIES, F. G., LINTHICUM, K. J. & JAMES, A. D. 1985. Rainfall and epizootic Rift Valley fever. *Bull World Health Organ*, 63, 941-3.
- DAVIES, F. G. & MARTIN, V. 2006. Recognizing Rift Valley Fever. *Vet Ital*, 42, 31-53.
- DEMEURE, C. E., BLANCHET, C., FITTING, C., FAYOLLE, C., KHUN, H., SZATANIK, M., MILON, G., PANTHIER, J. J., JAUBERT, J., MONTAGUTELLI, X., HUERRE, M., CAVAILLON, J. M. & CARNIEL, E. 2012. Early systemic bacterial dissemination and

- a rapid innate immune response characterize genetic resistance to plague of SEG mice. *J Infect Dis*, 205, 134-43.
- DEPRISTO, M. A., BANKS, E., POPLIN, R., GARIMELLA, K. V., MAGUIRE, J. R., HARTL, C., PHILIPPAKIS, A. A., DEL ANGEL, G., RIVAS, M. A., HANNA, M., MCKENNA, A., FENNEL, T. J., KERNYTSKY, A. M., SIVACHENKO, A. Y., CIBULSKIS, K., GABRIEL, S. B., ALTSHULER, D. & DALY, M. J. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*, 43, 491-8.
- DEUTMAN, A. F. & KLOMP, H. J. 1981. Rift Valley fever retinitis. *Am J Ophthalmol*, 92, 38-42.
- DIPETRILLO, K., WANG, X., STYLIANOU, I. M. & PAIGEN, B. 2005. Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet*, 21, 683-92.
- DO VALLE, T. Z., BILLECOCQ, A., GUILLEMOT, L., ALBERTS, R., GOMMET, C., GEFFERS, R., CALABRESE, K., SCHUGHART, K., BOULOY, M., MONTAGUTELLI, X. & PANTHIER, J. J. 2010. A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *J Immunol*, 185, 6146-56.
- DUNGU, B., LOUW, I., LUBISI, A., HUNTER, P., VON TEICHMAN, B. F. & BOULOY, M. 2010. Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*, 28, 4581-7.
- EASTERDAY, B. C. 1965. Rift valley fever. *Adv Vet Sci*, 10, 65-127.
- EASTERDAY, B. C., MC, G. M., ROONEY, J. R. & MURPHY, L. C. 1962. The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs. *Am J Vet Res*, 23, 470-9.
- EICHLER, E. E., FLINT, J., GIBSON, G., KONG, A., LEAL, S. M., MOORE, J. H. & NADEAU, J. H. 2010. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet*, 11, 446-50.
- EIFAN, S., SCHNETTLER, E., DIETRICH, I., KOHL, A. & BLOMSTROM, A. L. 2013. Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses*, 5, 2447-68.
- EL IMAM, M., EL SABIQ, M., OMRAN, M., ABDALKAREEM, A., EL GAILI MOHAMED, M. A., ELBASHIR, A. & KHALAFALA, O. 2009. Acute renal failure associated with the Rift Valley fever: a single center study. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20, 1047-52.
- EL-HARRAK, M., MARTIN-FOLGAR, R., LLORENTE, F., FERNANDEZ-PACHECO, P., BRUN, A., FIGUEROLA, J. & JIMENEZ-CLAVERO, M. A. 2011. Rift Valley and West Nile virus antibodies in camels, North Africa. *Emerg Infect Dis*, 17, 2372-4.
- ELLIOTT, R. M. 1997. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med*, 3, 572-7.
- FENNER, F. 1975. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Madrid, September 1975. *Intervirology*, 6, 1-12.
- FILONE, C. M., HEISE, M., DOMS, R. W. & BERTOLOTTI-CIARLET, A. 2006. Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. *Virology*, 356, 155-64.
- FINDLAY, G. M. & HOWARD, E. M. 1952. The susceptibility of rats to Rift Valley fever in relation to age. *Ann Trop Med Parasitol*, 46, 33-7.
- FINDLAY, J. M. & DAUBNEY, R. 1931. The virus of rift valley fever or enzootic hepatitis. *Lancet*, 221, 1350-1351.
- FLAVIN, R., PELUSO, S., NGUYEN, P. L. & LODA, M. 2010. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, 6, 551-62.
- FONTENILLE, D., TRAORE-LAMIZANA, M., DIALLO, M., THONNON, J., DIGOUTTE, J. P. & ZELLER, H. G. 1998. New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerg Infect Dis*, 4, 289-93.

- FONTENILLE, D., TRAORE-LAMIZANA, M., ZELLER, H., MONDO, M., DIALLO, M. & DIGOUTTE, J. P. 1995. Short report: Rift Valley fever in western Africa: isolations from *Aedes* mosquitoes during an interepizootic period. *Am J Trop Med Hyg*, 52, 403-4.
- FORTIN, A., ABEL, L., CASANOVA, J. L. & GROS, P. 2007. Host genetics of mycobacterial diseases in mice and men: forward genetic studies of BCG-osis and tuberculosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 8, 163-92.
- FRANCIS, T. & MAGILL, T. P. 1935. Rift Valley Fever : A Report of Three Cases of Laboratory Infection and the Experimental Transmission of the Disease to Ferrets. *J Exp Med*, 62, 433-48.
- FRAZER, K. A., ESKIN, E., KANG, H. M., BOGUE, M. A., HINDS, D. A., BEILHARZ, E. J., GUPTA, R. V., MONTGOMERY, J., MORENZONI, M. M., NILSEN, G. B., PETHIYAGODA, C. L., STUVE, L. L., JOHNSON, F. M., DALY, M. J., WADE, C. M. & COX, D. R. 2007. A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature*, 448, 1050-3.
- FREED, I. 1951. Rift valley fever in man, complicated by retinal changes and loss of vision. *S Afr Med J*, 25, 930-2.
- FREIBERG, A. N., SHERMAN, M. B., MORAIS, M. C., HOLBROOK, M. R. & WATOWICH, S. J. 2008. Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. *J Virol*, 82, 10341-8.
- FREUDENBERG-HUA, Y., FREUDENBERG, J., KLUCK, N., CICHON, S., PROPPING, P. & NOTHEN, M. M. 2003. Single nucleotide variation analysis in 65 candidate genes for CNS disorders in a representative sample of the European population. *Genome Res*, 13, 2271-6.
- FUJIMURA, M., SONOBE, S., NISHIJIMA, Y., NIIZUMA, K., SAKATA, H., KURE, S. & TOMINAGA, T. 2014. Genetics and Biomarkers of Moyamoya Disease: Significance of RNF213 as a Susceptibility Gene. *J Stroke*, 16, 65-72.
- GATTI, D. M., SVENSON, K. L., SHABALIN, A., WU, L. Y., VALDAR, W., SIMECEK, P., GOODWIN, N., CHENG, R., POMP, D., PALMER, A., CHESLER, E. J., BROMAN, K. W. & CHURCHILL, G. A. 2014. Quantitative trait locus mapping methods for diversity outbred mice. *G3 (Bethesda)*, 4, 1623-33.
- GERRARD, S. R. & NICHOL, S. T. 2002. Characterization of the Golgi retention motif of Rift Valley fever virus G(N) glycoprotein. *J Virol*, 76, 12200-10.
- GINSBURG, D. 2011. Genetics and genomics to the clinic: a long road ahead. *Cell*, 147, 17-9.
- GIORGI, C., ACCARDI, L., NICOLETTI, L., GRO, M. C., TAKEHARA, K., HILDITCH, C., MORIKAWA, S. & BISHOP, D. H. 1991. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*, 180, 738-53.
- GOMMET, C., BILLECOQ, A., JOUVION, G., HASAN, M., ZAVERUCHA DO VALLE, T., GUILLEMOT, L., BLANCHET, C., VAN ROOIJEN, N., MONTAGUTELLI, X., BOULOY, M. & PANTHIER, J. J. 2011. Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1421.
- GOVE, C. D. & HEMS, D. A. 1978. Fatty acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Biochem J*, 170, 1-8.
- GRAHAM, R., TALENT, J., ALLISON, G., CLEVELAND, R., RADEMAKER, S., ROEMER, T., SHERMAN, W., SOKOLSKI, H. & VERMA, R. 2008. WORLD AT RISK: The Report of the Commission on the Prevention of WMD Proliferation and Terrorism.

- GRANTHAM, R. 1974. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, 185, 862-4.
- GREENWOOD, C. M., FUJIWARA, T. M., BOOTHROYD, L. J., MILLER, M. A., FRAPPIER, D., FANNING, E. A., SCHURR, E. & MORGAN, K. 2000. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet*, 67, 405-16.
- GUDBJARTSSON, D. F., WALTERS, G. B., THORLEIFSSON, G., STEFANSSON, H., HALLDORSSON, B. V., ZUSMANOVICH, P., SULEM, P., THORLACIUS, S., GYLFASSON, A., STEINBERG, S., HELGADOTTIR, A., INGASON, A., STEINTHORSDOTTIR, V., OLAFSDOTTIR, E. J., OLAFSDOTTIR, G. H., JONSSON, T., BORCH-JOHNSEN, K., HANSEN, T., ANDERSEN, G., JORGENSEN, T., PEDERSEN, O., ABEN, K. K., WITJES, J. A., SWINKELS, D. W., DEN HEIJER, M., FRANKE, B., VERBEEK, A. L., BECKER, D. M., YANEK, L. R., BECKER, L. C., TRYGGVADOTTIR, L., RAFNAR, T., GULCHER, J., KIEMENEY, L. A., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U. & STEFANSSON, K. 2008. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet*, 40, 609-15.
- GUENET, J. L. 2011. Animal models of human genetic diseases: do they need to be faithful to be useful? *Mol Genet Genomics*, 286, 1-20.
- GUENET, J. L. & BONHOMME, F. 2003. Wild mice: an ever-increasing contribution to a popular mammalian model. *Trends Genet*, 19, 24-31.
- HABJAN, M., PICHLMAIR, A., ELLIOTT, R. M., OVERBY, A. K., GLATTER, T., GSTAIGER, M., SUPERTI-FURGA, G., UNGER, H. & WEBER, F. 2009. NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Virol*, 83, 4365-75.
- HANOTTE, O., BRADLEY, D. G., OCHIENG, J. W., VERJEE, Y., HILL, E. W. & REGE, J. E. 2002. African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science*, 296, 336-9.
- HARTLEY, D. M., RINDERKNECHT, J. L., NIPP, T. L., CLARKE, N. P., SNOWDER, G. D., NATIONAL CENTER FOR FOREIGN, A. & ZOONOTIC DISEASE DEFENSE ADVISORY GROUP ON RIFT VALLEY, F. 2011. Potential effects of Rift Valley fever in the United States. *Emerg Infect Dis*, 17, e1.
- HASSAN, O. A., AHLM, C., SANG, R. & EVANDER, M. 2011. The 2007 Rift Valley fever outbreak in Sudan. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1229.
- HAYES, K. S., HAGER, R. & GRENCIS, R. K. 2014. Sex-dependent genetic effects on immune responses to a parasitic nematode. *BMC Genomics*, 15, 193.
- HEATON, N. S., PERERA, R., BERGER, K. L., KHADKA, S., LACOUNT, D. J., KUHN, R. J. & RANDALL, G. 2010. Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 17345-50.
- HEATON, N. S. & RANDALL, G. 2011. Multifaceted roles for lipids in viral infection. *Trends Microbiol*, 19, 368-75.
- HIMEIDAN, Y. E., KWEKA, E. J., MAHGOUB, M. M., EL RAYAH EL, A. & OUMA, J. O. 2014. Recent outbreaks of rift valley Fever in East Africa and the middle East. *Front Public Health*, 2, 169.
- HOEVE, M. A., MYLONAS, K. J., FAIRLIE-CLARKE, K. J., MAHAJAN, S. M., ALLEN, J. E. & GRAHAM, A. L. 2009. Plasmodium chabaudi limits early Nippostrongylus brasiliensis-induced pulmonary immune activation and Th2 polarization in co-infected mice. *BMC Immunol*, 10, 60.

- HOU, Z., LETA, E. & JUNG, L. K. 1996. Cross-linking CD7 on myeloblasts results in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production. *Blood*, 88, 124-9.
- HUNTER, K. W. & CRAWFORD, N. P. 2008. The future of mouse QTL mapping to diagnose disease in mice in the age of whole-genome association studies. *Annu Rev Genet*, 42, 131-41.
- HUNTER, P., ERASMUS, B. J. & VORSTER, J. H. 2002. Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep. *Onderstepoort J Vet Res*, 69, 95-8.
- IKEGAMI, T. 2012. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Res*, 95, 293-310.
- IKEGAMI, T. & MAKINO, S. 2011. The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses*, 3, 493-519.
- IKEGAMI, T., NARAYANAN, K., WON, S., KAMITANI, W., PETERS, C. J. & MAKINO, S. 2009. Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF2alpha phosphorylation. *PLoS Pathog*, 5, e1000287.
- IKEGAMI, T., WON, S., PETERS, C. J. & MAKINO, S. 2006. Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J Virol*, 80, 2933-40.
- JAMES, W. S. & MILLICAN, D. 1986. Host-adaptive antigenic variation in Bunyaviruses. *J Gen Virol*, 67 (Pt 12), 2803-6.
- JENEY, V., RAMOS, S., BERGMAN, M. L., BECHMANN, I., TISCHER, J., FERREIRA, A., OLIVEIRA-MARQUES, V., JANSE, C. J., REBELO, S., CARDOSO, S. & SOARES, M. P. 2014. Control of disease tolerance to malaria by nitric oxide and carbon monoxide. *Cell Rep*, 8, 126-36.
- JIN, H. & ELLIOTT, R. M. 1993. Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol*, 67, 1396-404.
- JOUBERT, J. D., FERGUSON, A. L. & GEAR, J. 1951. Rift Valley fever in South Africa: 2. The occurrence of human cases in the Orange Free State, the north-western Cape province, the western and southern Transvaal. A Epidemiological and clinical findings. *S Afr Med J*, 25, 890-1.
- JOVEN, J., ESPINEL, E., RULL, A., BELTRAN-DEBON, R., ARAGONES, G., RODRIGUEZ-GALLEGO, E., CAMPS, J., PEDRO-BOTET, J., SANS, T., MENENDEZ, J. A. & ALONSO-VILLAVARDE, C. 2011. Serum fatty acid synthase concentration is increased in patients with hepatitis viral infection and may assist in the prediction of liver steatosis. *J Clin Virol*, 51, 199-201.
- KALVERAM, B., LIHORADOVA, O. & IKEGAMI, T. 2011. NSs protein of rift valley fever virus promotes posttranslational downregulation of the TFIIF subunit p62. *J Virol*, 85, 6234-43.
- KAMADA, F., AOKI, Y., NARISAWA, A., ABE, Y., KOMATSUZAKI, S., KIKUCHI, A., KANNO, J., NIIHORI, T., ONO, M., ISHII, N., OWADA, Y., FUJIMURA, M., MASHIMO, Y., SUZUKI, Y., HATA, A., TSUCHIYA, S., TOMINAGA, T., MATSUBARA, Y. & KURE, S. 2011. A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet*, 56, 34-40.
- KASARI, T. R., CARR, D. A., LYNN, T. V. & WEAVER, J. T. 2008. Evaluation of pathways for release of Rift Valley fever virus into domestic ruminant livestock, ruminant wildlife, and human populations in the continental United States. *J Am Vet Med Assoc*, 232, 514-29.

- KEANE, T. M., GOODSTADT, L., DANECEK, P., WHITE, M. A., WONG, K., YALCIN, B., HEGER, A., AGAM, A., SLATER, G., GOODSON, M., FURLOTTE, N. A., ESKIN, E., NELLAKE, C., WHITLEY, H., CLEAK, J., JANOWITZ, D., HERNANDEZ-PLIEGO, P., EDWARDS, A., BELGARD, T. G., OLIVER, P. L., MCINTYRE, R. E., BHOMRA, A., NICOD, J., GAN, X., YUAN, W., VAN DER WEYDEN, L., STEWARD, C. A., BALA, S., STALKER, J., MOTT, R., DURBIN, R., JACKSON, I. J., CZECHANSKI, A., GUERRA-ASSUNCAO, J. A., DONAHUE, L. R., REINHOLDT, L. G., PAYSEUR, B. A., PONTING, C. P., BIRNEY, E., FLINT, J. & ADAMS, D. J. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*, 477, 289-94.
- KEREM, B., ROMMENS, J. M., BUCHANAN, J. A., MARKIEWICZ, D., COX, T. K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M. & TSUI, L. C. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245, 1073-80.
- KITCHEN, S. F. 1934. Laboratory infections with the virus of rift valley fever *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14, 547-564.
- KORTEKAAS, J. 2014. One Health approach to Rift Valley fever vaccine development. *Antiviral Res*, 106, 24-32.
- KORTEKAAS, J., ZINGESER, J., DE LEEUW, P., DE LA ROCQUE, S., UNGER, H. & MOORMANN, R. J. 2011. Rift Valley Fever Vaccine Development, Progress and Constraints. *Emerg Infect Dis*, 17, e1.
- KOVER, P. X. & SCHAAL, B. A. 2002. Genetic variation for disease resistance and tolerance among Arabidopsis thaliana accessions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11270-4.
- KREHER, F., TAMIETTI, C., GOMMET, C., GUILLEMOT, L., ERMONVAL, M., FAILLOUX, A. B., PANTHIER, J. J., BOULOY, M. & FLAMAND, M. 2014. The Rift Valley fever accessory proteins NSm and P78/NSm-GN are distinct determinants of virus propagation in vertebrate and invertebrate hosts. *Emerg Microbes Infect*, 3, e71.
- KUMAR, P., HENIKOFF, S. & NG, P. C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*, 4, 1073-81.
- LAUGHLIN, L. W., GIRGIS, N. I., MEEGAN, J. M., STRAUSBAUGH, L. J., YASSIN, M. W. & WATTEN, R. H. 1978. Clinical studies on Rift Valley fever. Part 2: Ophthalmologic and central nervous system complications. *J Egypt Public Health Assoc*, 53, 183-4.
- LE COUPANEC, A., BABIN, D., BOULOY, M. & CHOUMET, V. 2014. Clone 13-infected Aedes aegypti salivary components inhibit Rift Valley fever virus pathogenicity. *Microbes Infect*, 16, 439-44.
- LE MAY, N., DUBAELE, S., PROIETTI DE SANTIS, L., BILLECOCQ, A., BOULOY, M. & EGLY, J. M. 2004. TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell*, 116, 541-50.
- LE MAY, N., MANSUROGLU, Z., LEGER, P., JOSSE, T., BLOT, G., BILLECOCQ, A., FLICK, R., JACOB, Y., BONNEFOY, E. & BOULOY, M. 2008. A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog*, 4, e13.
- LEGER, P., LARA, E., JAGLA, B., SISMEIRO, O., MANSUROGLU, Z., COPPEE, J. Y., BONNEFOY, E. & BOULOY, M. 2013. Dicer-2- and Piwi-mediated RNA interference in Rift Valley fever virus-infected mosquito cells. *J Virol*, 87, 1631-48.
- LEIBUNDGUT, M., MAIER, T., JENNI, S. & BAN, N. 2008. The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 714-25.
- LETTRE, G., JACKSON, A. U., GIEGER, C., SCHUMACHER, F. R., BERNDT, S. I., SANNA, S., EYHERAMENDY, S., VOIGHT, B. F., BUTLER, J. L., GUIDUCCI, C., ILLIG, T., HACKETT, R., HEID, I. M., JACOBS, K. B., LYSSSENKO, V., UDA, M., DIABETES

- GENETICS, I., FUSION, KORA, PROSTATE, L. C., OVARIAN CANCER SCREENING, T., NURSES' HEALTH, S., SARDINIA, BOEHNKE, M., CHANOCK, S. J., GROOP, L. C., HU, F. B., ISOMAA, B., KRAFT, P., PELTONEN, L., SALOMAA, V., SCHLESSINGER, D., HUNTER, D. J., HAYES, R. B., ABECASIS, G. R., WICHMANN, H. E., MOHLKE, K. L. & HIRSCHHORN, J. N. 2008. Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nat Genet*, 40, 584-91.
- LIM, J. K., LISCO, A., MCDERMOTT, D. H., HUYNH, L., WARD, J. M., JOHNSON, B., JOHNSON, H., PAPE, J., FOSTER, G. A., KRYSZTOF, D., FOLLMANN, D., STRAMER, S. L., MARGOLIS, L. B. & MURPHY, P. M. 2009. Genetic variation in OAS1 is a risk factor for initial infection with West Nile virus in man. *PLoS Pathog*, 5, e1000321.
- LINTHICUM, K. J., DAVIES, F. G., KAIRO, A. & BAILEY, C. L. 1985. Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg (Lond)*, 95, 197-209.
- LIU, L., CELMA, C. C. & ROY, P. 2008. Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins. *Virology*, 5, 82.
- LIU, W., MORITO, D., TAKASHIMA, S., MINEHARU, Y., KOBAYASHI, H., HITOMI, T., HASHIKATA, H., MATSUURA, N., YAMAZAKI, S., TOYODA, A., KIKUTA, K., TAKAGI, Y., HARADA, K. H., FUJIYAMA, A., HERZIG, R., KRISCHEK, B., ZOU, L., KIM, J. E., KITAKAZE, M., MIYAMOTO, S., NAGATA, K., HASHIMOTO, N. & KOIZUMI, A. 2011. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*, 6, e22542.
- LOPEZ-VELEZ, R. & MOLINA MORENO, R. 2005. [Climate change in Spain and risk of infectious and parasitic diseases transmitted by arthropods and rodents]. *Rev Esp Salud Publica*, 79, 177-90.
- LORENZO, G., LOPEZ-GIL, E., WARIMWE, G. M. & BRUN, A. 2015. Understanding Rift Valley fever: contributions of animal models to disease characterization and control. *Mol Immunol*, 66, 78-88.
- LU, J. T., CAMPEAU, P. M. & LEE, B. H. 2014. Genotype-phenotype correlation--promiscuity in the era of next-generation sequencing. *N Engl J Med*, 371, 593-6.
- LYONS, M. J. & HEYDUK, J. 1973. Aspects of the developmental morphology of California encephalitis virus in cultured vertebrae and arthropod cells and in mouse brain. *Virology*, 54, 37-52.
- MAAR, S. A., SWANEPOEL, R. & GELFAND, M. 1979. Rift Valley fever encephalitis. A description of a case. *Cent Afr J Med*, 25, 8-11.
- MACNEIL, A. & ROLLIN, P. E. 2012. Ebola and Marburg hemorrhagic fevers: neglected tropical diseases? *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1546.
- MACOWAN, K. D. 1994. The development of a livestock industry in Kenya. *Vet Hist*, 8, 29-37.
- MAIER, T., JENNI, S. & BAN, N. 2006. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311, 1258-62.
- MALLER, J., GEORGE, S., PURCELL, S., FAGERNESS, J., ALTSHULER, D., DALY, M. J. & SEDDON, J. M. 2006. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38, 1055-9.
- MALO, D., VOGAN, K., VIDAL, S., HU, J., CELLIER, M., SCHURR, E., FUKS, A., BUMSTEAD, N., MORGAN, K. & GROS, P. 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics*, 23, 51-61.

- MANDELL, R. B. & FLICK, R. 2010. Rift Valley fever virus: an unrecognized emerging threat? *Hum Vaccin*, 6, 597-601.
- MANOLIO, T. A., COLLINS, F. S., COX, N. J., GOLDSTEIN, D. B., HINDORFF, L. A., HUNTER, D. J., MCCARTHY, M. I., RAMOS, E. M., CARDON, L. R., CHAKRAVARTI, A., CHO, J. H., GUTTMACHER, A. E., KONG, A., KRUGLYAK, L., MARDIS, E., ROTIMI, C. N., SLATKIN, M., VALLE, D., WHITTEMORE, A. S., BOEHNKE, M., CLARK, A. G., EICHLER, E. E., GIBSON, G., HAINES, J. L., MACKAY, T. F., MCCARROLL, S. A. & VISSCHER, P. M. 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461, 747-53.
- MARTIN, V., CHEVALIER, V., CECCATO, P., ANYAMBA, A., DE SIMONE, L., LUBROTH, J., DE LA ROCQUE, S. & DOMENECH, J. 2008. The impact of climate change on the epidemiology and control of Rift Valley fever. *Rev Sci Tech*, 27, 413-26.
- MARTIN-ACEBES, M. A., BLAZQUEZ, A. B., JIMENEZ DE OYA, N., ESCRIBANO-ROMERO, E. & SAIZ, J. C. 2011. West Nile virus replication requires fatty acid synthesis but is independent on phosphatidylinositol-4-phosphate lipids. *PLoS One*, 6, e24970.
- MASHIMO, T., LUCAS, M., SIMON-CHAZOTTES, D., FRENKIEL, M. P., MONTAGUTELLI, X., CECCALDI, P. E., DEUBEL, V., GUENET, J. L. & DESPRES, P. 2002. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11311-6.
- MCCLELLAN, J. & KING, M. C. 2010. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell*, 141, 210-7.
- MILLER, S. I., ERNST, R. K. & BADER, M. W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol*, 3, 36-46.
- MIYAWAKI, S., IMAI, H., SHIMIZU, M., YAGI, S., ONO, H., MUKASA, A., NAKATOMI, H., SHIMIZU, T. & SAITO, N. 2013. Genetic variant RNF213 c.14576G>A in various phenotypes of intracranial major artery stenosis/occlusion. *Stroke*, 44, 2894-7.
- MOREL, L., BLENMAN, K. R., CROKER, B. P. & WAKELAND, E. K. 2001. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1787-92.
- MOREL, L., CROKER, B. P., BLENMAN, K. R., MOHAN, C., HUANG, G., GILKESON, G. & WAKELAND, E. K. 2000. Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6670-5.
- MOREL, L., MOHAN, C., YU, Y., CROKER, B. P., TIAN, N., DENG, A. & WAKELAND, E. K. 1997. Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J Immunol*, 158, 6019-28.
- MOREL, L., RUDOFISKY, U. H., LONGMATE, J. A., SCHIFFENBAUER, J. & WAKELAND, E. K. 1994. Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus. *Immunity*, 1, 219-29.
- MORRILL, J. C., CARPENTER, L., TAYLOR, D., RAMSBURG, H. H., QUANCE, J. & PETERS, C. J. 1991. Further evaluation of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in sheep. *Vaccine*, 9, 35-41.
- MORRILL, J. C., JENNINGS, G. B., COSGRIFF, T. M., GIBBS, P. H. & PETERS, C. J. 1989. Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferon-alpha. *Rev Infect Dis*, 11 Suppl 4, S815-25.
- MORRILL, J. C., JENNINGS, G. B., JOHNSON, A. J., COSGRIFF, T. M., GIBBS, P. H. & PETERS, C. J. 1990. Pathogenesis of Rift Valley fever in rhesus monkeys: role of interferon response. *Arch Virol*, 110, 195-212.

- MORVAN, J., FONTENILLE, D., SALUZZO, J. F. & COULANGES, P. 1991. Possible Rift Valley fever outbreak in man and cattle in Madagascar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85, 108.
- MOSER, T. S., SCHIEFFER, D. & CHERRY, S. 2012. AMP-activated kinase restricts Rift Valley fever virus infection by inhibiting fatty acid synthesis. *PLoS Pathog*, 8, e1002661.
- MOUSE GENOME SEQUENCING, C., WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., AGARWALA, R., AINSCOUGH, R., ALEXANDERSSON, M., AN, P., ANTONARAKIS, S. E., ATTWOOD, J., BAERTSCH, R., BAILEY, J., BARLOW, K., BECK, S., BERRY, E., BIRREN, B., BLOOM, T., BORK, P., BOTCHERBY, M., BRAY, N., BRENT, M. R., BROWN, D. G., BROWN, S. D., BULT, C., BURTON, J., BUTLER, J., CAMPBELL, R. D., CARNINCI, P., CAWLEY, S., CHIAROMONTE, F., CHINWALLA, A. T., CHURCH, D. M., CLAMP, M., CLEE, C., COLLINS, F. S., COOK, L. L., COPLEY, R. R., COULSON, A., COURONNE, O., CUFF, J., CURWEN, V., CUTTS, T., DALY, M., DAVID, R., DAVIES, J., DELEHAUNTY, K. D., DERI, J., DERMITZAKIS, E. T., DEWEY, C., DICKENS, N. J., DIEKHANS, M., DODGE, S., DUBCHAK, I., DUNN, D. M., EDDY, S. R., ELNITSKI, L., EMES, R. D., ESWARA, P., EYRAS, E., FELSENFELD, A., FEWELL, G. A., FLICEK, P., FOLEY, K., FRANKEL, W. N., FULTON, L. A., FULTON, R. S., FUREY, T. S., GAGE, D., GIBBS, R. A., GLUSMAN, G., GNERRE, S., GOLDMAN, N., GOODSTADT, L., GRAFHAM, D., GRAVES, T. A., GREEN, E. D., GREGORY, S., GUIGO, R., GUYER, M., HARDISON, R. C., HAUSSLER, D., HAYASHIZAKI, Y., HILLIER, L. W., HINRICHS, A., HLAVINA, W., HOLZER, T., HSU, F., HUA, A., HUBBARD, T., HUNT, A., JACKSON, I., JAFFE, D. B., JOHNSON, L. S., JONES, M., JONES, T. A., JOY, A., KAMAL, M., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-62.
- MOUTAILLER, S., KRIDA, G., SCHAFFNER, F., VAZEILLE, M. & FAILLOUX, A. B. 2008. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8, 749-53.
- MULLER, R., POCH, O., DELARUE, M., BISHOP, D. H. & BOULOY, M. 1994. Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol*, 75 (Pt 6), 1345-52.
- MULLER, R., SALUZZO, J. F., LOPEZ, N., DREIER, T., TURELL, M., SMITH, J. & BOULOY, M. 1995. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg*, 53, 405-11.
- MURATA, S., YANAGISAWA, K., FUKUNAGA, K., ODA, T., KOBAYASHI, A., SASAKI, R. & OHKOHCHI, N. 2010. Fatty acid synthase inhibitor cerulenin suppresses liver metastasis of colon cancer in mice. *Cancer Sci*, 101, 1861-5.
- MURITHI, R. M., MUNYUA, P., ITHONDEKA, P. M., MACHARIA, J. M., HIGHTOWER, A., LUMAN, E. T., BREIMAN, R. F. & NJENGA, M. K. 2011. Rift Valley fever in Kenya: history of epizootics and identification of vulnerable districts. *Epidemiol Infect*, 139, 372-80.
- MUYEMBE-TAMFUM, J. J., MULANGU, S., MASUMU, J., KAYEMBE, J. M., KEMP, A. & PAWESKA, J. T. 2012. Ebola virus outbreaks in Africa: past and present. *Onderstepoort J Vet Res*, 79, 451.
- NCBI RESOURCE COORDINATORS 2015. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 43, D6-17.

- NEOGEN CORP. 2012. *MegaMUGA : High Density Mouse Universal Genotyping Array* [Online]. Neogen Corporation. Available: <http://www.neogen.com/Genomics/pdf/Slicks/MegaMUGAFlyer.pdf> [Accessed 25 July 2015].
- NIAID. 2015. *Biodefense and Emerging Infectious Diseases* [Online]. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Available: <http://www.niaid.nih.gov/topics/biodefenserelated/biodefense/pages/cata.aspx> [Accessed 25 July 2015].
- OELOFSEN, M. J. & VAN DER RYST, E. 1999. Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus? *Onderstepoort J Vet Res*, 66, 51-4.
- OEM, J. K., JACKEL-CRAM, C., LI, Y. P., ZHOU, Y., ZHONG, J., SHIMANO, H., BABIUK, L. A. & LIU, Q. 2008. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *J Gen Virol*, 89, 1225-30.
- OLIVE, M. M., GOODMAN, S. M. & REYNES, J. M. 2012. The role of wild mammals in the maintenance of Rift Valley fever virus. *J Wildl Dis*, 48, 241-66.
- PAN, H., YAN, B. S., ROJAS, M., SHEBZUKHOV, Y. V., ZHOU, H., KOBZIK, L., HIGGINS, D. E., DALY, M. J., BLOOM, B. R. & KRAMNIK, I. 2005. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature*, 434, 767-72.
- PANTHIER, J. J. & MONTAGUTELLI, X. 2012. [The Collaborative Cross, a groundbreaking tool to tackle complex traits]. *Med Sci (Paris)*, 28, 103-8.
- PANTHIER, J. J., MONTAGUTELLI, X. & GUENET, J. L. 2003. *Génétique de la souris*, Belin Biologie editions.
- PATTARADILOKRAT, S., LI, J., WU, J., QI, Y., EASTMAN, R. T., ZILVERSMIT, M., NAIR, S. C., HUAMAN, M. C., QUINONES, M., JIANG, H., LI, N., ZHU, J., ZHAO, K., KANEKO, O., LONG, C. A. & SU, X. Z. 2014. Plasmodium genetic loci linked to host cytokine and chemokine responses. *Genes Immun*, 15, 145-52.
- PATTERSON, J. L., HOLLOWAY, B. & KOLAKOSKY, D. 1984. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J Virol*, 52, 215-22.
- PEPIN, M., BOULOY, M., BIRD, B. H., KEMP, A. & PAWESKA, J. 2010. Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res*, 41, 61.
- PERELYGIN, A. A., SCHERBIK, S. V., ZHULIN, I. B., STOCKMAN, B. M., LI, Y. & BRINTON, M. A. 2002. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 9322-7.
- PETERS, C. J., JONES, D., TROTTER, R., DONALDSON, J., WHITE, J., STEPHEN, E. & SLONE, T. W., JR. 1988. Experimental Rift Valley fever in rhesus macaques. *Arch Virol*, 99, 31-44.
- PETERS, C. J. & SLONE, T. W. 1982. Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection. *J Med Virol*, 10, 45-54.
- PEYRE, M., CHEVALIER, V., ABDO-SALEM, S., VELTHUIS, A., ANTOINE-MOUSSIAUX, N., THIRY, E. & ROGER, F. 2015. A Systematic Scoping Study of the Socio-Economic Impact of Rift Valley Fever: Research Gaps and Needs. *Zoonoses Public Health*, 62, 309-25.
- PFEFFER, M. & DOBLER, G. 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors*, 3, 35.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI,

- P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-8.
- PONNUSAMY, D. & CLINKENBEARD, K. D. 2012. Yersinia pestis intracellular parasitism of macrophages from hosts exhibiting high and low severity of plague. *PLoS One*, 7, e42211.
- PORTERFIELD, J. S., CASALS, J., CHUMAKOV, M. P., GAIDAMOVICH, S. Y., HANNOUN, C., HOLMES, I. H., HORZINEK, M. C., MUSSGAY, M., OKER-BLOM, N. & RUSSELL, P. K. 1975. Bunyaviruses and Bunyaviridae. *Intervirology*, 6, 13-24.
- RABERG, L., SIM, D. & READ, A. F. 2007. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, 318, 812-4.
- REECE, J. J., SIRACUSA, M. C. & SCOTT, A. L. 2006. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun*, 74, 4970-81.
- REED, C., STEELE, K. E., HONKO, A., SHAMBLIN, J., HENSLEY, L. E. & SMITH, D. R. 2012. Ultrastructural study of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology*, 431, 58-70.
- RICH, K. M. & PERRY, B. D. 2011. The economic and poverty impacts of animal diseases in developing countries: new roles, new demands for economics and epidemiology. *Prev Vet Med*, 101, 133-47.
- RIORDAN, J. R., ROMMENS, J. M., KEREM, B., ALON, N., ROZMAHEL, R., GRZELCZAK, Z., ZIELENSKI, J., LOK, S., PLAVSIC, N., CHOU, J. L. & ET AL. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066-73.
- RITTER, M., BOULOY, M., VIALAT, P., JANZEN, C., HALLER, O. & FRESE, M. 2000. Resistance to Rift Valley fever virus in Rattus norvegicus: genetic variability within certain 'inbred' strains. *J Gen Virol*, 81, 2683-8.
- ROGER, M., GIRARD, S., FAHAROUDINE, A., HALIFA, M., BOULOY, M., CETRE-SOSSAH, C. & CARDINALE, E. 2011. Rift valley fever in ruminants, Republic of Comoros, 2009. *Emerg Infect Dis*, 17, 1319-20.
- ROLIN, A. I., BERRANG-FORD, L. & KULKARNI, M. A. 2013. The risk of Rift Valley fever virus introduction and establishment in the United States and European Union. *Emerg Microbes Infect*, 2, e81.
- ROMMENS, J. M., IANNUZZI, M. C., KEREM, B., DRUMM, M. L., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J. L., KENNEDY, D., HIDAKA, N. & ET AL. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245, 1059-65.
- ROSE, A. M. & BELL, L. C. 2012. Epistasis and immunity: the role of genetic interactions in autoimmune diseases. *Immunology*, 137, 131-8.
- ROYER, N. 2015. *The History of fancy mice* [Online]. American Fancy Rat & Mouse Association. Available: <http://afrma.org/historymse.htm> [Accessed 25 July 2015].
- RUSSELL, R. C. 1987. Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports. *Bull World Health Organ*, 65, 659-62.
- SABIN, A. B. & BLUMBERG, R. W. 1947. Human infection with Rift Valley fever virus and immunity twelve years after single attack. *Proc Soc Exp Biol Med*, 64, 385-9.
- SALIB, M. & SOBHAY, M. I. 1978. Epidemic maculopathy. *Bull Ophthalmol Soc Egypt*, 71, 103-6.

- SANCHO-SHIMIZU, V., KHAN, R., MOSTOWY, S., LARIVIERE, L., WILKINSON, R., RIENDEAU, N., BEHR, M. & MALO, D. 2007. Molecular genetic analysis of two loci (Ity2 and Ity3) involved in the host response to infection with *Salmonella typhimurium* using congenic mice and expression profiling. *Genetics*, 177, 1125-39.
- SCHMALJOHN, C. S. & PATTERSON, J. L. 1990. Bunyaviridae and Their Replication. In: KNIPE, D. & HOWLEY, P. M. (eds.) *Fields Virology*. Second ed. New York: Raven Press.
- SCHNEIDER, B. S. & HIGGS, S. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102, 400-8.
- SCHRIRE, L. 1951. Macular changes in rift valley fever. *S Afr Med J*, 25, 926-30.
- SCHULE, R. & EVANS, R. M. 1991. Cross-coupling of signal transduction pathways: zinc finger meets leucine zipper. *Trends Genet*, 7, 377-81.
- SCHWACHTJE, J., MINCHIN, P. E., JAHNKE, S., VAN DONGEN, J. T., SCHITTKO, U. & BALDWIN, I. T. 2006. SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12935-40.
- SCOTT, R. M. & SMITH, E. R. 2009. Moyamoya disease and moyamoya syndrome. *N Engl J Med*, 360, 1226-37.
- SHARMA, M., BHATTACHARYYA, S., NAIN, M., KAUR, M., SOOD, V., GUPTA, V., KHASA, R., ABDIN, M. Z., VRATI, S. & KALIA, M. 2014. Japanese encephalitis virus replication is negatively regulated by autophagy and occurs on LC3-I- and EDEM1-containing membranes. *Autophagy*, 10, 1637-51.
- SHERMAN, M. B., FREIBERG, A. N., HOLBROOK, M. R. & WATOWICH, S. J. 2009. Single-particle cryo-electron microscopy of Rift Valley fever virus. *Virology*, 387, 11-5.
- SHERRY, S. T., WARD, M. H., KHOLODOV, M., BAKER, J., PHAN, L., SMIGIELSKI, E. M. & SIROTKIN, K. 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29, 308-11.
- SIAM, A. L., MEEGAN, J. M. & GHARBAWI, K. F. 1980. Rift Valley fever ocular manifestations: observations during the 1977 epidemic in Egypt. *Br J Ophthalmol*, 64, 366-74.
- SIDWELL, R. W. & SMEE, D. F. 2003. Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res*, 57, 101-11.
- SIMON, A. Y., MORITOH, K., TORIGOE, D., ASANO, A., SASAKI, N. & AGUI, T. 2009. Multigenic control of resistance to Sendai virus infection in mice. *Infect Genet Evol*, 9, 1253-9.
- SINDATO, C., KARIMURIBO, E. D., PFEIFFER, D. U., MBOERA, L. E., KIVARIA, F., DAUTU, G., BERNARD, B. & PAWESKA, J. T. 2014. Spatial and temporal pattern of Rift Valley fever outbreaks in Tanzania; 1930 to 2007. *PLoS One*, 9, e88897.
- SISSOKO, D., GIRY, C., GABRIE, P., TARANTOLA, A., PETTINELLI, F., COLLET, L., D'ORTENZIO, E., RENAULT, P. & PIERRE, V. 2009. Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*, 15, 568-70.
- SKAMENE, E. 1994. The Bcg gene story. *Immunobiology*, 191, 451-60.
- SMITH, D. R., STEELE, K. E., SHAMBLIN, J., HONKO, A., JOHNSON, J., REED, C., KENNEDY, M., CHAPMAN, J. L. & HENSLEY, L. E. 2010. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology*, 407, 256-67.
- SNELL, G. D. 1948. Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet*, 49, 87-108.
- SOTI, V., TRAN, A., DEGENNE, P., CHEVALIER, V., LO SEEN, D., THIONGANE, Y., DIALLO, M., GUEGAN, J. F. & FONTENILLE, D. 2012. Combining hydrology and mosquito

- population models to identify the drivers of Rift Valley fever emergence in semi-arid regions of West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*, 6, e1795.
- STEENSMA, D. P., KYLE, R. A. & SHAMPO, M. A. 2010. Abbie Lathrop, the "mouse woman of Granby": rodent fancier and accidental genetics pioneer. *Mayo Clin Proc*, 85, e83.
- STILLWELL, R. & BIERER, B. E. 2001. T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. *Immunol Res*, 24, 31-52.
- STRUHL, K. 1989. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*, 14, 137-40.
- STRUTHERS, J. K., SWANEPOEL, R. & SHEPHERD, S. P. 1984. Protein synthesis in Rift Valley fever virus-infected cells. *Virology*, 134, 118-24.
- SUZUKI, J. & TAKAKU, A. 1969. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol*, 20, 288-99.
- SVENSON, K. L., GATTI, D. M., VALDAR, W., WELSH, C. E., CHENG, R., CHESLER, E. J., PALMER, A. A., MCMILLAN, L. & CHURCHILL, G. A. 2012. High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. *Genetics*, 190, 437-47.
- SWANEPOEL, R. & COETZER, J. A. 2004. Rift Valley fever. In: COETZER, J. A. & TUSTIN, R. C. (eds.) *Infectious diseases of livestock*. Cape Town: Oxford University Press Southern Africa.
- SWANEPOEL, R., MANNING, B. & WATT, J. A. 1979. Fatal Rift Valley fever of man in Rhodesia. *Cent Afr J Med*, 25, 1-8.
- TAKADA, T., EBATA, T., NOGUCHI, H., KEANE, T. M., ADAMS, D. J., NARITA, T., SHIN, I. T., FUJISAWA, H., TOYODA, A., ABE, K., OBATA, Y., SAKAKI, Y., MORIWAKI, K., FUJIYAMA, A., KOHARA, Y. & SHIROISHI, T. 2013. The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res*, 23, 1329-38.
- TANTELY, L. M., BOYER, S. & FONTENILLE, D. 2015. A review of mosquitoes associated with Rift Valley fever virus in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*, 92, 722-9.
- TIFFIN, P. & RAUSHER, M. D. 1999. Genetic Constraints and Selection Acting on Tolerance to Herbivory in the Common Morning Glory *Ipomoea purpurea*. *Am Nat*, 154, 700-716.
- VAN VELDEN, D. J., MEYER, J. D., OLIVIER, J., GEAR, J. H. & MCINTOSH, B. 1977. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. *S Afr Med J*, 51, 867-71.
- VIALAT, P., BILLECOCQ, A., KOHL, A. & BOULOY, M. 2000. The S segment of rift valley fever phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *J Virol*, 74, 1538-43.
- VIDAL, S. M., MALO, D., MARQUIS, J. F. & GROS, P. 2008. Forward genetic dissection of immunity to infection in the mouse. *Annu Rev Immunol*, 26, 81-132.
- VON BONSDORFF, C. H. & PETTERSSON, R. 1975. Surface structure of Uukuniemi virus. *J Virol*, 16, 1296-307.
- WADE, C. M., KULBOKAS, E. J., 3RD, KIRBY, A. W., ZODY, M. C., MULLIKIN, J. C., LANDER, E. S., LINDBLAD-TOH, K. & DALY, M. J. 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420, 574-8.
- WALTER, C. T. & BARR, J. N. 2011. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*, 92, 2467-84.
- WASMOEN, T. L., KAKACH, L. T. & COLLETT, M. S. 1988. Rift Valley fever virus M segment: cellular localization of M segment-encoded proteins. *Virology*, 166, 275-80.

- WEAVER, S. C. & BARRETT, A. D. 2004. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*, 2, 789-801.
- WEAVER, S. C. & REISEN, W. K. 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*, 85, 328-45.
- WEEDON, M. N., LANGO, H., LINDGREN, C. M., WALLACE, C., EVANS, D. M., MANGINO, M., FREATHY, R. M., PERRY, J. R., STEVENS, S., HALL, A. S., SAMANI, N. J., SHIELDS, B., PROKOPENKO, I., FARRALL, M., DOMINICZAK, A., DIABETES GENETICS, I., WELLCOME TRUST CASE CONTROL, C., JOHNSON, T., BERGMANN, S., BECKMANN, J. S., VOLLENWEIDER, P., WATERWORTH, D. M., MOOSER, V., PALMER, C. N., MORRIS, A. D., OUWEHAND, W. H., CAMBRIDGE, G. E. M. C., ZHAO, J. H., LI, S., LOOS, R. J., BARROSO, I., DELOUKAS, P., SANDHU, M. S., WHEELER, E., SORANZO, N., INOUE, M., WAREHAM, N. J., CAULFIELD, M., MUNROE, P. B., HATTERSLEY, A. T., MCCARTHY, M. I. & FRAYLING, T. M. 2008. Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nat Genet*, 40, 575-83.
- WHO 2003. Intensified Control of Neglected Diseases - Report of an International Workshop, Berlin.
- WHO 2005. Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases, Berlin.
- WHO 2014. WHO: Ebola Response Roadmap Situation Report.
- WHO 2015a. Ebola Situation Report.
- WHO. 2015b. *Pandemic and Epidemic Diseases* [Online]. World Health Organization. Available: <http://www.who.int/csr/disease/en/> [Accessed 25 July 2015].
- WOOD, A. R., ESKO, T., YANG, J., VEDANTAM, S., PERS, T. H., GUSTAFSSON, S., CHU, A. Y., ESTRADA, K., LUAN, J., KUTALIK, Z., AMIN, N., BUCHKOVICH, M. L., CROTEAU-CHONKA, D. C., DAY, F. R., DUAN, Y., FALL, T., FEHRMANN, R., FERREIRA, T., JACKSON, A. U., KARJALAINEN, J., LO, K. S., LOCKE, A. E., MAGI, R., MIHAILOV, E., PORCU, E., RANDALL, J. C., SCHERAG, A., VINKHUYZEN, A. A., WESTRA, H. J., WINKLER, T. W., WORKALEMAHU, T., ZHAO, J. H., ABSHER, D., ALBRECHT, E., ANDERSON, D., BARON, J., BEEKMAN, M., DEMIRKAN, A., EHRET, G. B., FEENSTRA, B., FEITOSA, M. F., FISCHER, K., FRASER, R. M., GOEL, A., GONG, J., JUSTICE, A. E., KANONI, S., KLEBER, M. E., KRISTIANSOON, K., LIM, U., LOTAY, V., LUI, J. C., MANGINO, M., MATEO LEACH, I., MEDINA-GOMEZ, C., NALLS, M. A., NYHOLT, D. R., PALMER, C. D., PASKO, D., PECHLIVANIS, S., PROKOPENKO, I., RIED, J. S., RIPKE, S., SHUNGIN, D., STANCAKOVA, A., STRAWBRIDGE, R. J., SUNG, Y. J., TANAKA, T., TEUMER, A., TROMPET, S., VAN DER LAAN, S. W., VAN SETTEN, J., VAN VLIET-OSTAPTCHOUK, J. V., WANG, Z., YENGO, L., ZHANG, W., AFZAL, U., ARNLOV, J., ARSCOTT, G. M., BANDINELLI, S., BARRETT, A., BELLIS, C., BENNETT, A. J., BERNE, C., BLUHER, M., BOLTON, J. L., BOTTCHER, Y., BOYD, H. A., BRUINENBERG, M., BUCKLEY, B. M., BUYSKE, S., CASPERSEN, I. H., CHINES, P. S., CLARKE, R., CLAUDI-BOEHM, S., COOPER, M., DAW, E. W., DE JONG, P. A., DEELEN, J., DELGADO, G., et al. 2014. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat Genet*, 46, 1173-86.
- YADANI, F. Z., KOHL, A., PREHAUD, C., BILLECOQ, A. & BOULOY, M. 1999. The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *J Virol*, 73, 5018-25.
- YALCIN, B., WONG, K., AGAM, A., GOODSON, M., KEANE, T. M., GAN, X., NELLAKER, C., GOODSTADT, L., NICOD, J., BHOMRA, A., HERNANDEZ-PLIEGO, P., WHITLEY, H.,

- CLEAK, J., DUTTON, R., JANOWITZ, D., MOTT, R., ADAMS, D. J. & FLINT, J. 2011. Sequence-based characterization of structural variation in the mouse genome. *Nature*, 477, 326-9.
- YANG, H., BELL, T. A., CHURCHILL, G. A. & PARDO-MANUEL DE VILLENA, F. 2007. On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet*, 39, 1100-7.
- YANG, H., WANG, J. R., DIDION, J. P., BUUS, R. J., BELL, T. A., WELSH, C. E., BONHOMME, F., YU, A. H., NACHMAN, M. W., PIALEK, J., TUCKER, P., BOURSOT, P., MCMILLAN, L., CHURCHILL, G. A. & DE VILLENA, F. P. 2011. Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse. *Nat Genet*, 43, 648-55.
- YANG, W., HOOD, B. L., CHADWICK, S. L., LIU, S., WATKINS, S. C., LUO, G., CONRADS, T. P. & WANG, T. 2008. Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology*, 48, 1396-403.
- YASSIN, W. 1978. Clinico-pathological picture in five human cases died with Rift Valley fever. *J Egypt Public Health Assoc*, 53, 191-3.
- YOSHIDA, Y., MAKITA, Y., HEIDA, N., ASANO, S., MATSUSHIMA, A., ISHII, M., MOCHIZUKI, Y., MASUYA, H., WAKANA, S., KOBAYASHI, N. & TOYODA, T. 2009. PosMed (Positional Medline): prioritizing genes with an artificial neural network comprising medical documents to accelerate positional cloning. *Nucleic Acids Res*, 37, W147-52.
- ZHANG, Z. & GERSTEIN, M. 2003. Patterns of nucleotide substitution, insertion and deletion in the human genome inferred from pseudogenes. *Nucleic Acids Res*, 31, 5338-48.
- ZINSSTAG, J., SCHELLING, E., ROTH, F., BONFOH, B., DE SAVIGNY, D. & TANNER, M. 2007. Human benefits of animal interventions for zoonosis control. *Emerg Infect Dis*, 13, 527-31.
- ZUK, O., HECHTER, E., SUNYAEV, S. R. & LANDER, E. S. 2012. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 1193-8.

Génétique de la résistance à la fièvre de la Vallée du Rift :

Rvfs2 confère une tolérance à l'hépatite

Rúben Leandro Batista

Abstract

Rift Valley fever (RVF) is an emerging zoonosis, caused by an arbovirus, the Rift Valley fever virus (RVFV). The disease affects mainly livestock, although it can also have a severe impact on human health. In humans, RVF may progress into fatal outcomes due to acute hepatitis or encephalitis. To date, no human vaccine or specific treatment is available. Recent genetic studies emphasized the influence of the host genetic background on the outcome of the disease, but the identity of causative genes remains unknown. In the present work, we studied the genetic factors determining the susceptibility of MBT/Pas and the resistance of BALB/c mouse inbred strains to RVFV. We identified 3 QTLs linked to survival upon infection on chromosomes 2, 5 and 11. These QTLs were named *Rvfs1*, *Rvfs3* and *Rvfs2*, respectively. The *in vivo* challenging of the corresponding congenic strains, C.MBT-*Rvfs1*, -2 and -3, confirmed the role of *Rvfs2* on the susceptibility to RVF. We investigated pathophysiological mechanisms and showed that both C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mice exhibit early onset severe hepatitis. However, while C.MBT-*Rvfs2* died rapidly from liver failure, BALB/c mice tolerated the liver disease and regenerated the hepatic tissue, thus, avoiding a premature death. These mice eventually died at a later stage from encephalitis. These observations indicate that each of the C.MBT-*Rvfs2* and BALB/c mouse models recapitulates one form of the human disease, hepatitis and encephalitis, respectively. We generated subcongenic strains harboring the *Rvfs2* region and tested their susceptibility to RVF. The results were combined with high-throughput analyses of the structural and regulatory variants found in the region. Our combined approach allowed the identification of three candidate genes: *Rnf213*, *Cd7* and *Fasn*. The known function of the *Fasn* gene suggests that it could play a role in the mechanism of liver regeneration and, thus, *Fasn* is our best candidate gene to account for the susceptibility phenotype.

Keywords : Rift Valley fever, Complex Traits, Mouse, Hepatitis, Liver Regeneration, Tolerance

Résumé

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une zoonose émergente provoquée par le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR). La FVR affecte principalement le bétail, mais peut aussi toucher l'Homme. La maladie peut évoluer, chez l'Homme, sous deux formes mortelles: une fièvre hémorragique et une encéphalite. Aucun traitement ou vaccin n'est disponible. Bien que des études récentes démontrent l'importance du fonds génétique dans l'issue de la FVR, l'identité des gènes responsables reste inconnue. Dans ce travail, nous avons étudié les facteurs génétiques qui déterminent la sensibilité accrue de la lignée consanguine de souris MBT/Pas et la résistance relative de la lignée BALB/c à la FVR. Nous avons identifié trois QTLs sur les chromosomes 2, 5 et 11, que nous avons nommés *Rvfs1*, *Rvfs3* et *Rvfs2*, respectivement. Une infection des lignées congéniques correspondantes, C.MBT-*Rvfs1*, -2 et -3, a confirmé le rôle de la région *Rvfs2* dans la sensibilité à la FVR. Nous avons réalisé une analyse pathophysiologique et montré que les souris C.MBT-*Rvfs2* et BALB/c développent précocement une hépatite. Les souris C.MBT-*Rvfs2* meurent de cette hépatite aiguë. En revanche, les souris BALB/c régénèrent leur foie, ce qui leur permet de mieux tolérer l'atteinte hépatique. La majorité des souris BALB/c sont décédées plus tard d'une encéphalite. Ces observations montrent que les modèles C.MBT-*Rvfs2* et BALB/c reproduisent chacune des deux formes de la maladie observées chez l'Homme, l'hépatite et l'encéphalite, respectivement. Nous avons produit des lignées sous-congéniques pour la région *Rvfs2* et avons testé leur sensibilité à l'infection. Les résultats ont été croisés avec une analyse des variants de structure et de régulation présents dans l'intervalle. Cette stratégie a permis d'identifier 3 gènes candidats : *Rnf213*, *Cd7* et *Fasn*. La fonction connue du gène *Fasn* suggère qu'il puisse jouer un rôle important lors de la régénération du foie et ainsi être le facteur génétique que nous recherchons.

Mots-clés : fièvre de la Vallée du Rift, Caractères complexes, Souris, Hépatite, Régénération du foie, Tolérance