



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact de la diversité génétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift sur sa virulence et son cycle de réplication

Mehdi Chabert-Ben Cherifa

## ► To cite this version:

Mehdi Chabert-Ben Cherifa. Etude de l'impact de la diversité génétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift sur sa virulence et son cycle de réplication. Virologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10165 . tel-04428064

**HAL Id: tel-04428064**

**<https://theses.hal.science/tel-04428064>**

Submitted on 31 Jan 2024

**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.



# **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 341  
Evolution Ecosystème Microbiologie Modélisation**

**Discipline** : Virologie

Soutenue publiquement le 07/12/2022, par :  
**CHABERT—BEN CHERIFA Mehdi**

---

## **Etude de l'impact de la diversité génétique du virus de la fièvre de la vallée du Rift sur sa virulence et son cycle de réplication**

---

Devant le jury composé de :

Doublet Patricia	Professeur	CIRI-Lyon 1	Présidente
Bréard Emmanuel	Chargé de recherche	ANSES - Maisons Alfort	Examinateur
Kohl Alain	Professeur	Université de Glasgow	Rapporteur
Moutailler Sara	Directrice de recherche	ANSES - Maisons Alfort	Rapporteuse
Ogliastro Mylène	Directrice de recherche	INRAE - Montpellier	Rapporteuse
Arnaud Frédéric	Directeur de recherche	INRAE-Lyon	Directeur de thèse
Ratinier Maxime	Maitre de conférences	EPHE-Lyon	Co-directeur de thèse
Cêtre-Sossah Catherine	Directrice de recherche	CIRAD-Montpellier	Co-directrice de thèse

## Serment du docteur

« En présence de mes pairs.

« Parvenu(e) à l'issue de mon doctorat en virologie, et ayant ainsi pratiqué, dans ma quête du savoir, l'exercice d'une recherche scientifique exigeante, en cultivant la rigueur intellectuelle, la réflexivité éthique et dans le respect des principes de l'intégrité scientifique, je m'engage, pour ce qui dépendra de moi, dans la suite de ma carrière professionnelle quel qu'en soit le secteur ou le domaine d'activité, à maintenir une conduite intègre dans mon rapport au savoir, mes méthodes et mes résultats. »

Ce travail a été réalisé au sein des unités de recherche UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée (IVPC), INRAe-UCBL-EPHE-VetAgroSup et UMR Animal, Santé, Territoires, Risques et Ecosystèmes (ASTRE), CIRAD.

Sous la direction de Dr. Frédérick ARNAUD, Dr. Catherine CETRE-SOSSAH et du Dr. Maxime RATINIER.

## Remerciements

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de mon jury Alain Kohl, Sara Moutailler, Mylène Ogliastro, Emmanuel Bréard et Patricia Doublet pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaiterais remercier aussi les membres de mon comité de suivi de thèse Stéphane Bertagnoli, Philippe Depres, Karen Moreau et Damien Vitour pour m'avoir accompagné au long de cette thèse et d'avoir apporté leurs conseils et leurs idées.

Je remercie Fabienne Archer, directrice de l'UMR754 IVPC de m'avoir permis de réaliser la grande majorité de mes travaux de thèse dans l'UMR754. Je remercie aussi notre gestionnaire aux multiples casquettes Sylvie Farget avec qui j'ai eu la chance d'interagir pour de nombreux sujets, de l'administratif jusqu'aux galères d'UGAP et des plastiques. Je voudrais aussi remercier Philippe Marianneau pour ces précieux conseils mais aussi sa collaboration avec Sandra Lacôte pour la partie *in vivo* de mon projet de thèse. Je remercie Sreenu Vattipally et Ana da Silva Filipe pour le séquençage haut débit et son analyse qui a été particulièrement précieuse pour ma thèse. Je profite aussi de l'occasion pour remercier les docteurs Mohamed Bezeid Ould El Mamy et Barry Yahya pour la collecte des souches terrain sans lequel ce projet aurait été bien différent.

Durant mon temps à l'IVPC j'ai eu la chance de côtoyer de nombreuses personnes issues des différentes équipes de recherche qui sont les PR2T dirigés par Caroline Roux et composés de Jocelyn Turpin, Barbara Gineys et Chritine Dolmason avec qui j'ai pu interagir ; les iWAYS qui comprend Fabienne Archer, Karine Maisse, Pierre-Yves Lozach, Alexandra Bobet-Erny, Céline Garnier et Catherine Luengo-Guyonnot et l'équipe Biologie des Bunyavirales (BUNYA) dans laquelle j'ai fait ma thèse.

Je remercie mes maîtres de thèse Frédérick Arnaud, Maxime Ratinier et Catherine Cêtre-Sossah, je vous remercie de vos précieux conseils, de tout ce que vous m'avez appris et de m'avoir laissé la chance d'explorer les pistes auxquelles conduisait la pelote que l'on a déroulé durant ma thèse. J'ai beaucoup appris au contact de vous trois, je vous remercie pour cela (et je sais que je me répète beaucoup dans cette partie-là). Frédérick j'ai eu de la chance de t'avoir comme encadrant et de m'avoir permis de participer à d'autre projet que celui de ma thèse et promis la prochaine les stats des manipes souris seront parfaites et un jour je ferai comme tu m'as suggéré et j'irai courir au Puit de Dôme. Catherine tu étais en distanciel mais ça ne t'a pas empêché d'apporter beaucoup au projet et à tout ce que j'ai appris et de m'accueillir pour couper des demi-cerveaux de souris. Merci beaucoup Maxime de m'avoir encadré au quotidien, d'avoir toujours eu ta porte ouverte et de m'avoir accompagné du début jusqu'à la fin, merci de m'avoir appris la résilience. Je sais que ça n'a pas toujours été facile, j'espère que je ne t'en ai pas trop fait baver avec toutes les galères de séquences, surtout de rédaction, tu as fait preuve de beaucoup de patience et tu m'as toujours poussé à me dépasser. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir proposé de participer au projet FORESEE et de réaliser cette thèse.

Passons à l'équipe des BUNYA composé de Maxime Ratinier, Frédérick Arnaud, Saw See Hong, Vincent Raquin, Barbara Viginier, Sophie Desloire, Marie-Pierre Confort et

Adrien Thiesson, je vous remercie tous chaleureusement pour votre accueil, vos conseils, les moments de rire et de galères que l'on a pu avoir durant toutes ces années. Je te remercie Barabara de m'avoir encadré durant le M2, de m'avoir appris toutes les bases, de m'avoir appris à manipuler en laboratoire de la culture cell à la BM et de m'avoir aussi permis de découvrir les joies du MOT.

J'aimerais particulièrement remercier Marie-Pierre Confort pour tout le temps que tu as passé à me former avec tes journées partagées le matin avec Adrien et l'après-midi avec moi, ce n'était pas facile. Je te remercie pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant ces 3 ans, de ton soutien indéfectible, et nos sessions hard rock (ou plus calme ça dépend des envies) dans le L3 vont me manquer. J'espère que tu continueras à chanter dans le box du nouveau L3, en attendant je te souhaite bon courage avec les RG de l'alphabet.

J'aimerais remercier aussi tous les étudiants du labo pour toutes les aventures que l'on a vécues ensemble du rallage sur la BM qui ne marche pas aux sessions bar bien sûr en passant par les parties endiablées de mölkky ou d'escalade. Maëva Duboeuf, Qilin Xin, Yu Gu, Benjamin Riocreux Verney, Marie Verneret, Sheryline Loison ça a été un plaisir de pouvoir vous côtoyer et passer ces années en votre compagnie. Adrien, tu n'es pas la blonde dont Max m'avait parlé au début (je l'ai rencontré après) ça n'a pas empêché de passer 3 superbes années à nettoyer les plâtres chacun son tour, mais qu'est-ce que on a passé de bons moments dans et en dehors du labo. Je te remercie pour chaque bière (et jus de fraise), session d'escalade ou les soirées. J'ai eu de la chance de vous avoir rencontré pour tous les bons moments que l'on a vécus ensemble et pour cela je ferai la première citation de ce manuscrit ici « bonne continuation.

Je remercie aussi les membres de l'Escadron de Circulation et d'Escorte de Réserve du 503 RT pour m'avoir permis de sortir de la science en changeant complètement d'environnement de temps en temps, je vous remercie pour votre patience dans ces derniers mois où je n'étais plus là et où le P1 est un navire sans capitaine.

Je remercie ma famille, mon père, ma mère et mon frère de toujours m'avoir soutenu durant ces années d'études même si je n'ai pas toujours été présent à la maison ou au restaurant. Je voudrais aussi remercier Audrey (la fameuse blonde) que j'ai eu la chance de rencontrer à la fin de la première année et qui, depuis, ne quitte plus ma vie (merci Chloé) je te remercie pour le soutien que tu m'as apporté dans les moments de bas et d'avoir partagé la joie des moments de haut. Je suis très heureux de t'avoir avec moi.

## Résumé :

La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) est une maladie vectorielle principalement transmise par les moustiques. Chez les ruminants, la FVR est responsable d'une forte mortalité néonatale et de nombreux avortements, avec des conséquences économiques importantes pour les pays touchés. La circulation du virus de la FVR (RVFV) est particulièrement active dans les pays d'Afrique de l'Ouest (Sénégal/Mauritanie) où la maladie est endémique.

Dans un premier temps, afin d'évaluer la virulence des souches circulantes du RVFV, deux souches de terrain ont été étudiées : la souche MRU25010-30 d'origine cameline isolée au nord de la Mauritanie (2010) et la souche MRU2687-3 d'origine caprine du sud de la Mauritanie (2013). Leurs capacités répliquatives et virulences ont été déterminées *in vivo* chez la souris BALB/c et *in vitro* sur plusieurs types de cellules telles que des hépatocytes humains (HepaRG), des cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) différenciées en cellules neurales (astrocytes, neurones et oligodendrocytes) et des cellules pulmonaires humain (A549, adénocarcinome). Dans le modèle souris, nous avons testé deux voies d'inoculation : intranasale (IN) ou sous-cutanée (SC). Quelle que soit la voie d'inoculation, SC ou IN, la souche MRU25010-30 induit une mortalité plus précoce des souris BALB/c (J3/4 p.i.) par rapport à MRU2687-3 (J8/10 p.i.). Cette mortalité induite par la MRU25010-30 est associée à une charge virale importante dans le foie des souris infectées et une détection précoce du virus dans le cerveau. Dans les différents modèles cellulaires étudiés, la souche MRU25010-30 a induit un titre infectieux 10 à 100 fois plus important que la souche MRU2687-3. Le séquençage profond a révélé que ces deux souches appartiennent à deux lignées génétiques distinctes de RVFV et qu'elles existent sous forme de sous-populations virales. Grâce à la technique de génétique inverse, nous avons montré qu'un seul segment génétique (le segment M) est responsable pour les différences de dynamique de répllication. L'exploration de la diversité intra-souche du segment M a permis l'identification de deux marqueurs génétiques viraux influençant la répllication virale de ces souches *in vitro* : un situé dans la glycoprotéine d'enveloppe Gn et l'autre dans la région non traduite du segment M.

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser des déterminants moléculaires clés du génome de deux souches de terrain de RVFV. La caractérisation de leurs mécanismes d'action devrait permettre, à terme, de mieux comprendre la virulence et la pathogénèse induite par RVFV. Ces travaux posent également les bases pour étudier le rôle de la protéine Gn du RVFV dans le cycle viral mais aussi la régulation de l'expression des protéines virales codées par le segment M.

**Mots Clés :** Arbovirus, Bunyavirus, Rift Valley fever virus, glycoprotéines, virulence, pathogénèse, segment M, cycle viral

## Abstract:

Rift Valley Fever (RVF) is a vector-borne disease mainly transmitted by mosquitoes. In ruminants, RVF is responsible for high neonatal mortality and numerous abortions, with important economic consequences for the affected countries. The circulation of RVFV is particularly active in West African countries (Senegal/Mauritania) where the disease is endemic.

Firstly, in order to assess the virulence of circulating RVFV strains, two field strains were studied: strain MRU25010-30 of camel origin isolated in northern Mauritania (2010) and strain MRU2687-3 of goat origin from southern Mauritania (2013). Their replicative capacities and virulence were determined *in vivo* in BALB/c mice and *in vitro* on several cell types such as human hepatocytes (HepaRG), induced pluripotent stem cells (hiPSC) differentiated into neural cells (astrocytes, neurons and oligodendrocytes) and human lung cells (A549, adenocarcinoma). In the mouse model, we tested two routes of inoculation: intranasal (IN) or subcutaneous (SC). Regardless of the route of inoculation, SC or IN, MRU25010-30 induced earlier mortality in BALB/c mice (D3/4 p.i.) compared to MRU2687-3 (D8/10 p.i.). This mortality induced by MRU25010-30 is associated with a high viral load in the liver of infected mice and an early detection of the virus in the brain. In the different cell models studied, MRU25010-30 induced a 10- to 100-fold higher infectious titer than MRU2687-3. Deep sequencing revealed that these two strains belong to two distinct genetic lineages of RVFV and exist as viral subpopulations. Using reverse genetics, we showed that a single genetic segment (the M segment) is responsible for the differences in replication dynamics. The exploration of the intra-strain diversity of the M segment allowed the identification of two viral genetic markers influencing the viral replication of these strains *in vitro*: one located in the envelope glycoprotein Gn and the other in the untranslated region of the M segment

My thesis work has enabled the characterization of key molecular determinants within RVFV genome of two field strains. The characterization of their mechanism of action should ultimately lead to a better understanding of RVFV-induced virulence and pathogenesis. This work also provides an interesting basis to study the role of RVFV Gn protein in the viral cycle and the regulation of the viral proteins expression encoded by the M segment.

**Title :** Study of the impact of genetic diversity of the Rift Valley fever virus on its virulence and replication cycle

**Keywords :** Arbovirus, Bunyaviruses, Rift Valley fever virus, glycoproteins, virulence, pathogenesis, segment M, viral cycle

## Table des matières

Résumé : .....	3
Abstract: .....	6
Remerciements.....	3
Table des figures.....	10
Table des abréviations .....	12
1 Introduction bibliographique.....	13
1.1 Arboviroses et maladies zoonotiques.....	13
1.2 Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift (FVR) .....	17
1.2.1 Première description de la FVR au Kenya (1930) .....	17
1.2.2 La FVR en Afrique du Sud .....	17
1.2.3 Première épidémie de grande envergure : le cas de l’Egypte en 1977/1978 .....	19
1.2.4 Introduction du RVFV dans la péninsule arabique.....	20
1.2.5 Phylogéographie du virus de la fièvre de la Vallée du Rift.....	22
1.2.6 Le cas particulier de l’Afrique de l’Ouest .....	27
1.3 Transmission de la FVR.....	35
1.3.1 Cycles de transmission .....	35
1.1.1 La circulation du RVFV pendant la période inter-épidémique.....	36
1.1.2 Les principales espèces de moustiques vectrices du RVFV.....	38
1.2 La fièvre de la Vallée du Rift.....	40
1.2.1 Chez les mammifères ruminants domestiques .....	40
1.1.1 Chez l’Homme .....	42
1.1.2 Les modèles expérimentaux : les modèles murins et le modèle souris	45
1.2 Mesures de lutte et de contrôle de la FVR .....	50
1.2.1 Mise en place de troupeaux sentinelles basée sur des cartes de risque d’occurrence de la FVR.....	50
1.2.2 La lutte anti vectorielle (LAV) .....	52
1.2.3 Approches vaccinales .....	53
1.2.4 Le système de génétique inverse de RVFV et ses applications vaccinales	57
1.3 Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift .....	59
1.3.1 Le génome viral .....	59
1.3.2 Le cycle viral.....	63



1.3.3	Les protéines structurales .....	68
1.3.4	Les protéines non structurales .....	75
2	Les objectifs de thèse.....	76
3	Résultats (Partie 1).....	78
	Comparative study of two Rift Valley fever virus field strains circulating in Mauritania in 2010 and 2013 reveals the hypervirulent nature of the MRU25010-30 strain isolated from camel.....	81
	Abstract.....	81
	Introduction .....	81
	Materials and methods.....	84
	Cell culture.....	84
	Viruses culture .....	85
	RACE-PCR .....	85
	Deep-sequencing analysis .....	85
	Bioinformatic analysis.....	86
	Phylogenetic and protein analysis.....	86
	Ethical statement.....	86
	<i>In vivo</i> virulence studies .....	86
	RT-qPCR.....	87
	RVFV serological assays (ELISA).....	87
	<i>In vitro</i> viral infection .....	87
	Immunofluorescence microscopy.....	88
	Results .....	89
	RVFV field isolates clustered in two distinct genetic lineages. ....	89
	RVFV MRU25010-30 is more virulent than MRU2687-3 in BALB/C mice. ....	91
	Early death induced by MRU25010-30 strain is associated with high viremia...	94
	RVFV organ tropism and dissection of the early stages of infection in BALB/c mice .....	96
	MRU25010-30 replicates more efficiently than MRU2687-3 in various <i>in vitro</i> cell culture models .....	98
	Discussion.....	100
	Conclusion .....	104
	Acknowledgements.....	104
	Supplementary data.....	104
4	Résultats (Partie 2).....	111
	Genetic diversity of Rift Valley fever Virus M-Segment modulates viral fitness...	112

Abstract.....	112
Introduction .....	112
Materials and Methods.....	115
Cells .....	115
Reverse genetics plasmids and mutagenesis.....	115
Viruses and reverse genetics viruses.....	115
Virus growth curves .....	116
Viral binding and entry assays .....	116
Viral release assay.....	117
Results .....	117
Characterisation of reverse genetics viruses .....	117
<i>in vitro</i> growth properties observed for MRU25010-30 and MRU2687-3 strains .....	119
Effect of the genetic diversity of the viral subpopulation on the replication of rMRU2687-3 and rMRU25010-30.....	120
K384 does not modulate the early stages of the viral infection .....	122
The nature of residue 384 impacts viral particles release. ....	124
Discussion.....	125
Acknowledgements.....	128
Supplementary data.....	128
5 Discussion .....	131
5.1 Mise en perspective des résultats avec les données épidémiologiques ...	131
5.2 La mutation C10U située à l'extrémité 5'UTR du segment M (anti-génome)	135
5.2.1 Analyse de la mutation C10U dans les séquences déposées de RVFV	135
5.2.2 La mutation U10C pourrait impacter le métabolisme de l'ARN du segment M .....	136
5.3 La mutation K384T située dans la glycoprotéine virale Gn .....	139
5.3.1 Analyse de la mutation K384T dans les séquences de RVFV disponibles dans les banques de données .....	139
5.3.2 Implications fonctionnelles de la mutation K384T sur les protéines Gn et p78	140
5.4 Conclusion.....	148
6 Références.....	150

## Table des figures

Figure 1 : Carte de la répartition géographique des 5 arboviroses majeures. Zika, la Dengue, la fièvre jaune, le Chikungunya et la fièvre de la Vallée du Rift (Leta et al. 2018b). .....	14
Figure 2 : Le virus du Nil occidental .....	15
Figure 3 : Taxonomie simplifiée de l'ordre des Bunyavirales (Gaudreault et al. 2019). .....	16
Figure 4 : Historique des épidémies et des épizooties de FVR en Afrique du Sud (Pienaar et Thompson 2013).....	19
Figure 5: Carte de la région du Jizan en Arabie Saoudite (Madani et al. 2003). ....	22
Figure 6 : Arbres phylogénétiques de RVFV basés sur le segment M .....	24
Figure 7: Analyses phylogéographiques du RVFV pour caractériser l'origine de l'introduction du RVFV .....	27
Figure 8 : Carte des zones écologiques caractérisées en Afrique de l'Ouest, de la Guinée au sud à la Mauritanie au Nord adapté des travaux de Stoek et ces collaborateurs (Stoek et al. 2022). .....	28
Figure 9 : Carte présentant les foyers épidémiques et épizootiques au Sénégal et en Mauritanie au cours du temps et en fonction de la pluviométrie annuelle (Arsevska et al. 2016).....	30
Figure 10 : Carte des interactions et de la mobilité animale .....	33
Figure 11 : Représentation schématique du cycle de transmission biologique du RVFV (Quellec et al. 2021).....	36
Figure 12 : Cycle de vie du moustique (Baranitharan Ph D 2018).....	38
Figure 13 : Carte de répartition de certaines espèces de moustiques vecteurs du RVFV en Afrique .....	39
Figure 14 : Singe Signes cliniques observées chez les dromadaires durant une l'épidémie de RVFV en Mauritanie, en 2010 en Mauritanie (El Mamy et al. 2011) ..	42
Figure 15 : Pathologie de la FVR chez les humains. Adapté de Ikegami et Makino 2011 (Ikegami et Makino 2011). .....	44
Figure 16 : Mesure du titre infectieux par organe chez des souris infectées par la souche ZH501 (Smith et al. 2010) .....	46
Figure 17: Etude de la virulence de plusieurs souches de RVFV chez la souris CD-1 (Ikegami et al. 2017a).....	49
Figure 18: Evolution des paramètres biologiques permettant le diagnostic de la FVR (Bird et al. 2009). .....	51
Figure 19 : Schéma présentant des approches de génétique inverse développées pour le RVFV .....	58
Figure 20 : Représentation schématique de la particule virale et de la structure du génome de RVFV .....	60
Figure 21 : Représentation schématique des séquences régulatrices de l'expression du génome viral .....	62
Figure 22 : Cycle viral du RVFV à l'échelle d'une cellule .....	65
Figure 23 : La particule virale de RVFV (Huiskonen et al. 2009) .....	67
Figure 24 : Les protéines L, N et le complexe RNP. ....	70
Figure 25 : Représentations schématiques de la topologie des protéines p78, Gn et Gc du RVFV (Spiegel et al. 2016). .....	72

Figure 26 : Structure de l'hétérodimère Gn/Gc.....	75
Figure 27 : Mécanismes cellulaires modulés par les protéines non structurales de RVFV .....	76
Figure 28 : Approches expérimentales utilisées dans ce chapitre pour caractériser moléculairement et phénotypiquement les isolats de terrain RVFV. ....	79
Figure 29 : Phylogenetic trees and protein sequences analysis of MRU25010-30 and MRU2687-3 strains .....	90
Figure 30 : Kaplan-Meier survival curves of BALB/C mice infected by MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains .....	93
Figure 31 : RVFV viremia kinetics in BALB/c mice .....	96
Figure 32 : Levels of RVFV RNA in the liver and brain of BALB/c infected mice. ...	96
Figure 33 : Levels of RVFV RNA in the serum, liver and brain of BALB/c mice at early stages of infection .....	98
Figure 34 : In vitro growth properties of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains .....	100
Figure 35 : Model of viral dissemination and replication of MRU25010-30 and MRU2687-3 strains in the liver and the brain of BALB/c infected mice .....	103
Figure 36 : Characterisation of the rescued rMRU2687-3 and rMRU25010-30 viruses .....	118
Figure 37 : Growth properties of reassortant viruses.....	119
Figure 38 : Impact of AUG0 and/or T384K mutations on the viral replication of the two RVFV strains .....	122
Figure 39 : Effect of K384T mutation on the early steps of rMRU25010-30 replication cycle .....	123
Figure 40 : Effect of K384T on the late steps of rMRU25010-30 replication cycle	125
Figure 41 : Courbe de croissance des souches ZH548 « wild type » et celles générées par génétique inverse. ....	136
Figure 42 : Mécanismes d'actions possibles de la mutation C10U dans l'extrémité 5'UTR du segment M (anti-génome).....	139
Figure 43 : Schéma de la barrière hémato encéphalique à l'interface entre le cortex et la dure-mère .....	143
Figure 44 : Structure du capsomère et interactions entre les domaines A et B de Gn en fonction du résidu 384.....	145
Figure 45 : Prédiction de la structure de la protéine p-78.....	147

## Table des abréviations

Ae	<i>Aedes</i>	MOI	Multiplicité d'infection
AERO	Aérosol	MRU	Mauritanie
An	<i>Anopheles</i>	N	Nucléocaprotéine
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	NSm	Non-Structurale protein M
ARN pol	ARN polymerase	NSs	Non-Structurale protein S
BHE / BBB	Barrière hémato-encéphalique / Blood brainbarrier	OIE	Office International des Epizooties
BTV	Bluetongue virus	OMSA	Organisation mondiale de la santé animale
CHIK	Chikungunya	PCR	Polycycle Chain Reaction
CT	Cytosolique tail	PFU	Plaque Forming Unit
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique	p.i.	Post infection
Cx	<i>Culex</i>	qPCR	Quantitative PCR
Gc	Glycoprotein C	RACE PCR	Rapid amplification of cDNA-ends by PCR
CDC	Center for Disease Control	RE	Réticulum endoplasmique
CVR	Center for Virus Research	RdRp	RNA dependant RNA polymerase
CNS / SNC	Central Nervous System / Système Nerveux Centrale	rLuc	Rapporteur luciferase
FISH	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>	RNP	Ribonucléoproteine
FRL	Fœtal Rhesus Monkey Lung	RVF / FVR	Rift Valley Fever / fièvre de la Vallée du Rift
Gn	Glycoprotein N	RVFV	Rift Valley fever virus / virus de la fièvre de la Vallée du Rift
IgG	Immunoglobuline G	RT-PCR	Reverse Transcription PCR
IgM	Immunoglobuline M	SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
IN	Intranasale	SC	Sous-cutanée
IP	Intra-péritonéale	SEN	Sénégal
L	Protein L	TCID50	Tissue Culture Infectious Dose 50%
LAV	Lutte Anti Vectorielle	USA	Etat-Unis
LD50	Lethal dose 50	UTR	Untranslated Region
LGp (p78)	Long Glycoprotein	UUKV	Uukuniemi virus
MERS	Middle East Respiratory Syndrome	YF	Fièvre jaune
ML	Mostlikelyhood	WHO / OMS	World health organisation / Organisation mondiale de la santé
MOM	Mitochondrial Outer Membrane	WNV	West Nile fever virus / virus du Nil Occidental

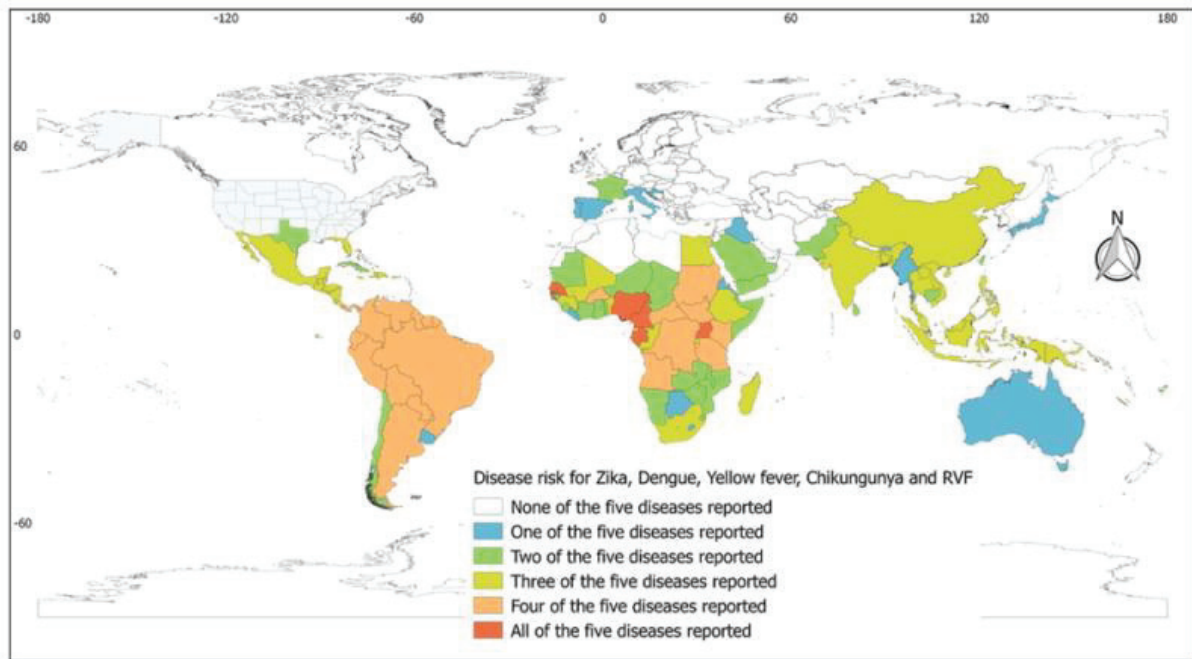
# 1 Introduction bibliographique

## 1.1 Arboviroses et maladies zoonotiques

Les arboviroses représentent 17% de l'ensemble des maladies virales décrites (WHO 2014). Causées par des arbovirus (arthropod-borne virus), elles sont transmises par des vecteurs arthropodes hématophages (moustiques, culicoïdes, tiques, phlébotomes, stomoxes, ...) d'un hôte mammifère (l'homme et/ou les animaux) à un autre mammifère et sont responsables d'épidémies et/ou d'épizooties. Étant donné leurs modes de transmission liés aux vecteurs arthropodes, elles ont une répartition géographique corrélée à la distribution mondiale des vecteurs qui les transmettent, touchant environ 3.9 milliards de personnes (WHO 2022). Les arboviroses sont à l'origine d'environ 1 million de décès par an (WHO 2014) et représentent donc un enjeu majeur de politique sanitaire et économique.

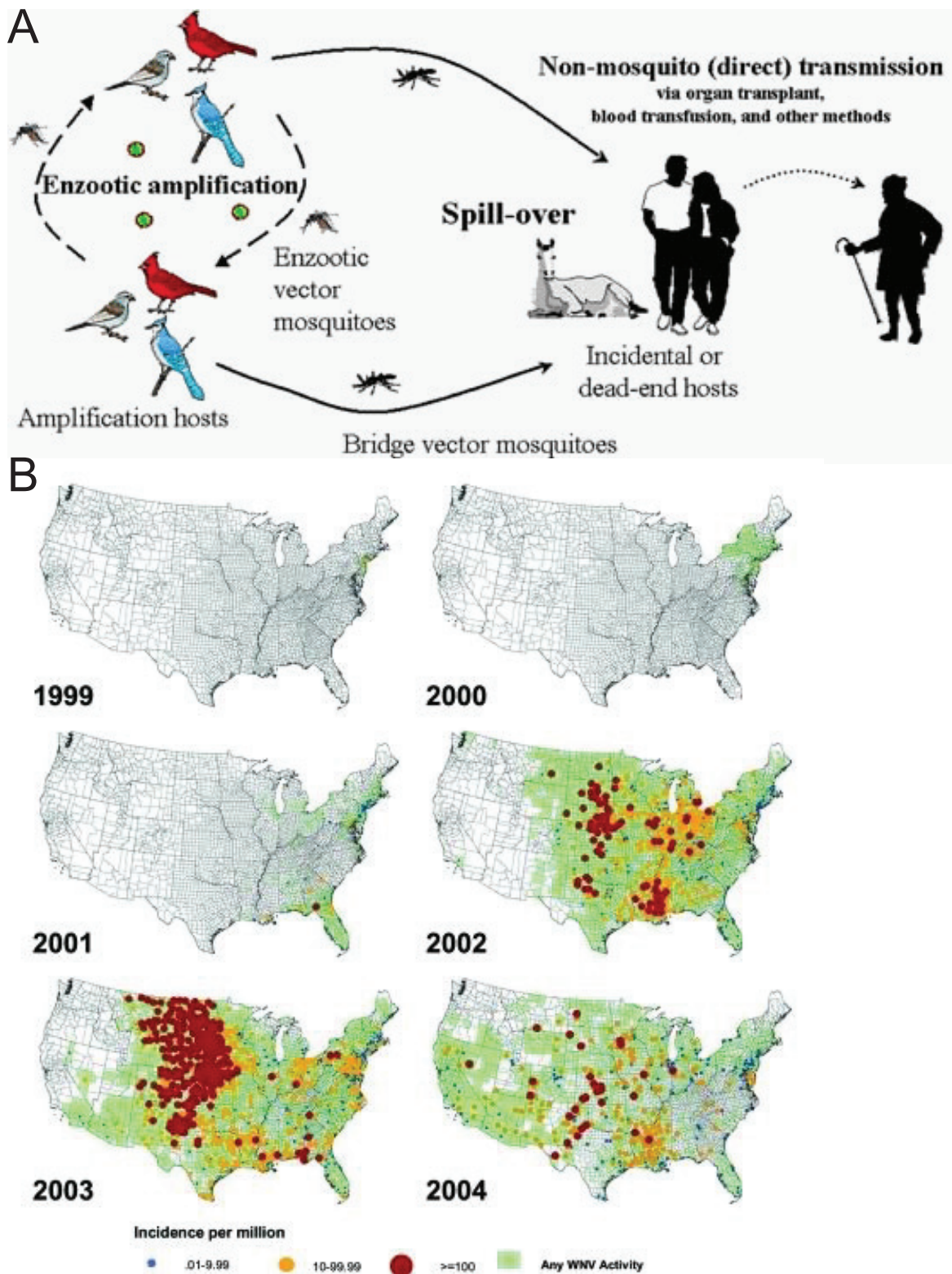
A ce jour, au moins 600 espèces virales différentes ont pu être décrites. Ce sont en grande majorité des virus enveloppés ayant un génome à ARN dont l'ordre des Bunyavirales est l'un des plus représentés (Abudurexiti *et al.* 2019).

Quant à leur répartition géographique, les régions subtropicales hébergent la plus grande diversité d'arboviroses à fort risque sanitaire telles que le chikungunya (CHIK), la dengue, la fièvre jaune (YF, Yellow fever), la fièvre de la Vallée du Rift (RVF, Rift Valley fever) (Leta *et al.* 2018a) (Figure 1). La distribution géographique des arboviroses évolue régulièrement avec un impact probable du réchauffement climatique qui pourrait favoriser l'implantation d'espèces vectrices connues d'arboviroses ou de nouvelles espèces vectrices dans de nouvelles zones géographiques (Leta *et al.* 2018b).



**Figure 1 : Carte de la répartition géographique des 5 arboviroses majeures. Zika, la Dengue, la fièvre jaune, le Chikungunya et la fièvre de la Vallée du Rift (Leta et al. 2018b).**

Le virus du Nil Occidental ou West Nile fever Virus (WNV) est un exemple intéressant de cette expansion géographique. Le WNV est transmis par des moustiques du genre *Culex* aux oiseaux qui constituent son réservoir naturel. Ce virus peut aussi infecter l'Homme et les équidés qui sont considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques (Figure 2A) (Hongoh *et al.* 2009). Chez l'Homme, des signes cliniques sont observés (i) chez les jeunes individus (moins de 3 ans), (ii) les personnes immunodéprimées et âgées (plus de 70 ans) avec notamment des atteintes neurologiques. Chez ces patients, l'apparition de méningite ou d'encéphalite conduisant au décès de jusqu'à 30% des patients (Campbell *et al.* 2002). Les hôtes survivants à l'infection peuvent présenter des séquelles jusqu'à 1 an après l'infection (Campbell *et al.* 2002). Ce virus est un exemple intéressant de dissémination vers le nord de l'hémisphère. En effet avant 1999, WNV n'était pas présent aux Etats-Unis d'Amérique (USA). Le virus a été détecté pour la première fois au Nord Est des USA en 2000. A partir de cette année-là, le virus s'est propagé vers l'Ouest du pays (Figure 2B). En 2004, des foyers d'infection étaient détectés sur la totalité du territoire américain (Hayes *et al.* 2005).



**Figure 2 :** Le virus du Nil occidental (A) Cycle de transmission du virus du Nil occidental (Hongoh et al. 2009). (B) Carte de l'incidence des infections par le WNV aux États-Unis au cours du temps (Hayes et al. 2005).

Certaines arboviroses, compte tenu de leur potentiel à provoquer une crise sanitaire et de l'absence de médicaments et/ou de vaccins efficaces, l'organisation mondiale



de la santé (OMS) les a classées dans la liste des maladies prioritaires qui incluent les maladies respiratoires dues à certains coronavirus (Middle East Respiratory Syndrome (MERS) et Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)), les fièvres hémorragiques de Crimée Congo (arbovirus), Ebola, Lassa et Marburg, la fièvre de la Vallée du Rift (arbovirus), la fièvre Zika (arbovirus) ainsi que les maladies causées par les virus Nipah et Hénipavirus (Mehand *et al.* 2018). La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) dont l'agent étiologique est le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV), présent en Afrique et dans la péninsule arabique (Nielsen *et al.* 2020), fait partie de l'ordre des *Bunyavirales*, qui comprend notamment les familles des *Arenaviridae*, *Hantaviridae* ainsi que la famille des *Phenuiviridae*. Cette dernière comprend le genre *Phlebovirus* qui est le plus riche en espèces décrites (Figure 3). Il compte parmi ces membres les virus Toscana, Punta Toro ainsi que le virus de la fièvre de la Vallée du Rift.

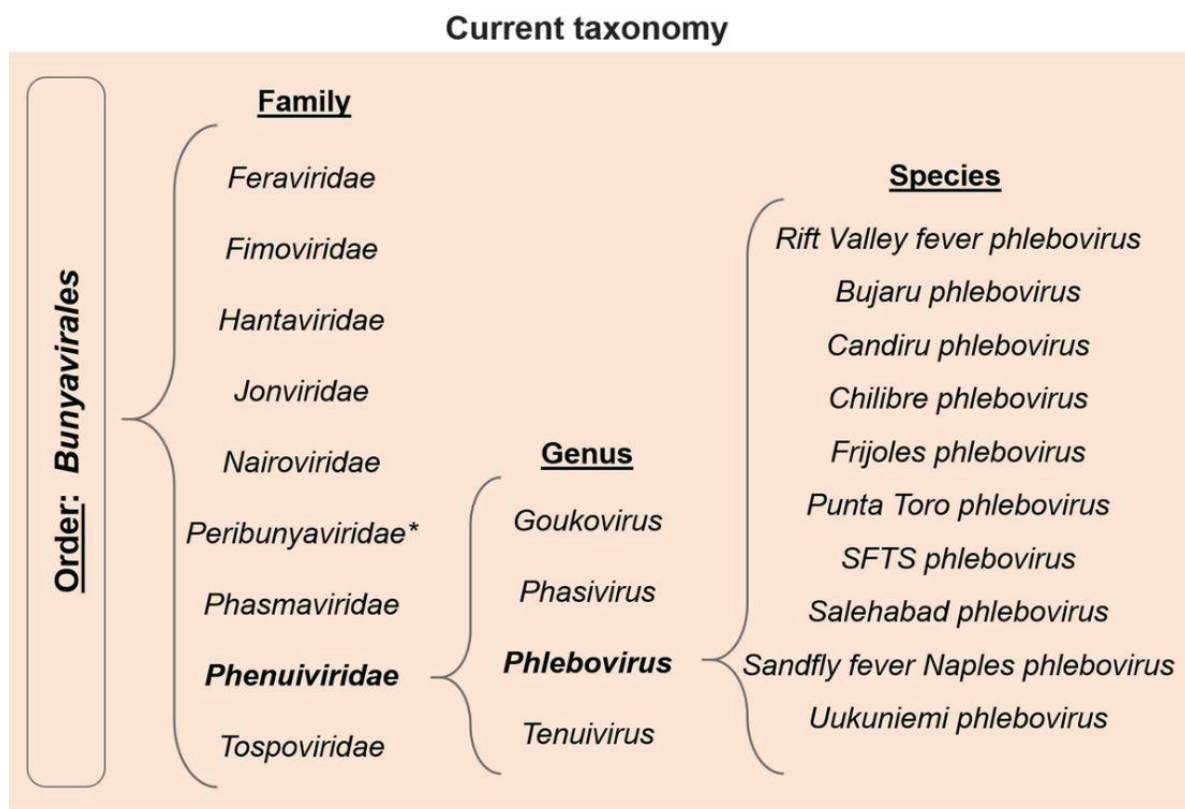


Figure 3 : Taxonomie simplifiée de l'ordre des *Bunyvirales* (Gaudreault *et al.* 2019).

Mon projet de thèse a pour objet d'étudier le virus de la fièvre de la Vallée du Rift. Dans la suite de mon introduction, je vais donc m'attacher à décrire l'histoire de cette maladie, son cycle de transmission, sa pathogénie chez les mammifères et le virus lui-même.

## 1.2 Epidémiologie de la fièvre de la Vallée du Rift (FVR)

### 1.2.1 Première description de la FVR au Kenya (1930)

En 1930, une maladie d'origine inconnue a été décrite au Kenya dans la vallée du Rift. Elle était caractérisée par l'apparition d'atteintes hépatiques importantes chez les agneaux et les moutons (Daubney *et al.* 1931). Les tests de mise en culture bactérienne n'ont pas permis de lier les lésions observées à la présence de bactéries. Les auteurs ont alors testé la capacité de transmission de la maladie à d'autres moutons sains en utilisant le sang des animaux ayant succombé à l'infection. La mesure de la température chez les moutons inoculés montre l'apparition d'un syndrome fébrile (température 41-42°C à partir du 3ème et 4ème jour post-inoculation). Certains des animaux infectés ont présenté une accumulation de mucus accompagnée de saignements nasaux. Chez les femelles gestantes infectées expérimentalement, le syndrome fébrile et hépatique s'accompagne d'avortements. L'ultrafiltration des foies des moutons a ensuite permis de déterminer la nature virale de l'agent responsable de la maladie. Les auteurs ont pu mettre en évidence la capacité du virus à infecter les bovins et les caprins et ainsi démontrer leur susceptibilité à l'infection (Daubney *et al.* 1931). Un syndrome similaire avait déjà été rapporté au Kenya en 1912 et en 1926 sans possibilité d'identifier l'agent responsable de la maladie (Gerken *et al.* 2022). Le caractère zoonotique de la FVR est suggéré du fait de la présence de cas humains de fièvre apparentée à la dengue, ayant touché des éleveurs d'ovins en 1930 mais n'ayant pas pu être confirmé comme des cas de dengue. Enfin, les auteurs émettent aussi l'hypothèse que la FVR puisse être vectorisée par les moustiques notamment du fait de la période à laquelle a eu lieu l'émergence (au cours du mois de septembre) ainsi que du nombre anormalement élevé, à la même période, de cas de paludisme due à une forte abondance de moustiques en lien avec une forte pluviométrie (Daubney *et al.* 1931).

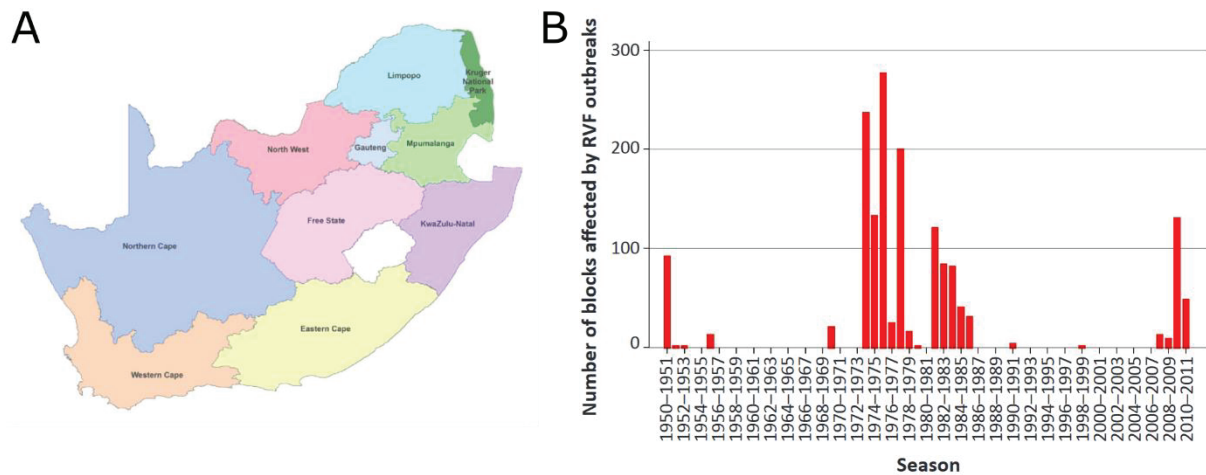
### 1.2.2 La FVR en Afrique du Sud

En décembre 1950, une épizootie touchant les moutons semblables à celle décrite par Daubney et collaborateurs en 1930 fut d'abord détectée dans le centre de l'Afrique de Sud (à l'ouest du Free State) puis, à partir du mois d'avril 1951, plusieurs autres cas sont détectés dans cette même région et celles du Cap-Nord et du Nord-Ouest (Figure 4A), entraînant la mort de 100,000 moutons et un nombre

d'avortements cinq fois plus élevés (Maquart *et al.* 2014; Pienaar et Thompson 2013; Gerdes 2004). A l'exception de deux cas dans l'état du Free State, les années suivantes furent relativement calmes en termes de circulation de la maladie. En 1956, une nouvelle épizootie, peu décrite, a cependant été rapportée par la division vétérinaire dans l'ouest du Free State. Cet épisode est suivi d'une période plus calme jusqu'aux années 1969-70 où de nouveaux cas de moutons infectés sont rapportés dans cette même région. Ces périodes entre épizooties sont appelées périodes inter-épidémiques (Pienaar et Thompson 2013).

De 1973 à 1976, l'Afrique du Sud a enregistré une importante circulation virale du virus de la FVR sur l'ensemble de son territoire. Durant cet épisode, de nombreux ovins ont été touchés par l'infection et de nombreux cas humains ont été identifiés dans les mêmes régions. Les cas humains présentaient des taux de morbidité et de létalité importants et supérieurs à ceux précédemment enregistrées au cours des épidémies précédentes (van Velden *et al.* 1977). Le séquençage des virus circulants en 1951 et en 1973/6 ainsi que la comparaison de leurs séquences montre qu'il s'agit de deux souches virales distinctes. Cet épisode est donc dû à l'introduction d'une nouvelle souche de RVFV (Grobbelaar *et al.* 2011). En conjonction de cet événement d'introduction, les conditions climatiques, avec de fortes pluies, ont été favorables à l'activité des vecteurs de RVFV. Au cours des années suivantes, entre les mois de novembre à juin, des épizooties sporadiques de FVR de faible intensité se sont produites à travers le pays.

Plus récemment, une épidémie, survenue de 2008 à 2011 a débuté dans l'état du Mpumalanga au nord-est s'est étendue à l'ensemble du pays en 2010. Au plus fort de l'épidémie, plus de 13 000 cas d'animaux ont été rapportés, majoritairement des chèvres et des moutons. Les animaux d'élevage en contact avec la faune sauvage présentaient le taux le plus élevé d'anticorps de type IgG dirigés contre RVFV (Ngoshe *et al.* 2020). Ces données sous-entendent que l'interaction avec la faune sauvage pourrait jouer un rôle important dans la circulation du virus. En plus des cas animaux, 484 cas humains ont été confirmés durant cette période épidémique (Pawęska *et al.* 2021; Fawzy et Helmy 2019). Le séquençage d'une souche virale isolée durant cet épisode a montré que plusieurs lignées génétiques de RVFV étaient à l'origine de l'épidémie de 2008 à 2011. Je reviendrai sur la classification des lignées de RVFV dans la partie 1.2.5.



**Figure 4 : Historique des épidémies et des épizooties de FVR en Afrique du Sud (Pienaar et Thompson 2013). (A) Carte illustrant les frontières territoriales de l’Afrique du Sud mises en place en 1994. (B) Distribution temporelle des foyers de FVR signalés en Afrique du Sud au cours de la période 1950-2011.**

L’étude rétrospective de la circulation de RVFV en Afrique du Sud illustre son endémicité sur ce territoire. Il est intéressant de noter le caractère morcelé dans le temps des événements épidémiques et épizootiques de grande ampleur (Figure 4B) comme celles qui ont marqué les périodes de 1951, 1973, 1983 et 2008. Ces événements semblent en partie causés par l’introduction ou la réintroduction de nouvelles souches de RVFV puisque le séquençage des différentes souches a révélé des différences génétiques importantes, associées à différentes lignées génétiques de RVFV.

### 1.2.3 Première épidémie de grande envergure : le cas de l’Egypte en 1977/1978

Dans les années 1977 et 1978, l’Egypte a connu la plus forte épidémie de FVR enregistrée à ce jour. Cette épidémie a été à l’origine d’une importante saturation des services sanitaires du pays avec plus de 18 000 cas humains confirmés qui ont entraîné le décès de 600 personnes, selon l’organisation mondiale de la santé (Meegan 1979). Plusieurs régions de l’Egypte ont été touchées, mais c’est la région située au niveau du delta du Nil qui a présenté le plus fort taux d’incidence et la majorité des cas. L’impact dans les zones urbanisées a été amplifié par un manque de connaissances générales sur les chaînes de transmission de la FVR et notamment, la transmission vectorielle de la maladie. Cependant, des cas ont été rapportés dans des zones où la densité de la population humaine était nettement inférieure telle que dans le désert du Sinaï. Selon Meegan, les cas d’infection par RVFV en dehors du delta du Nil pourraient être dus aux mouvements de populations infectés (Meegan

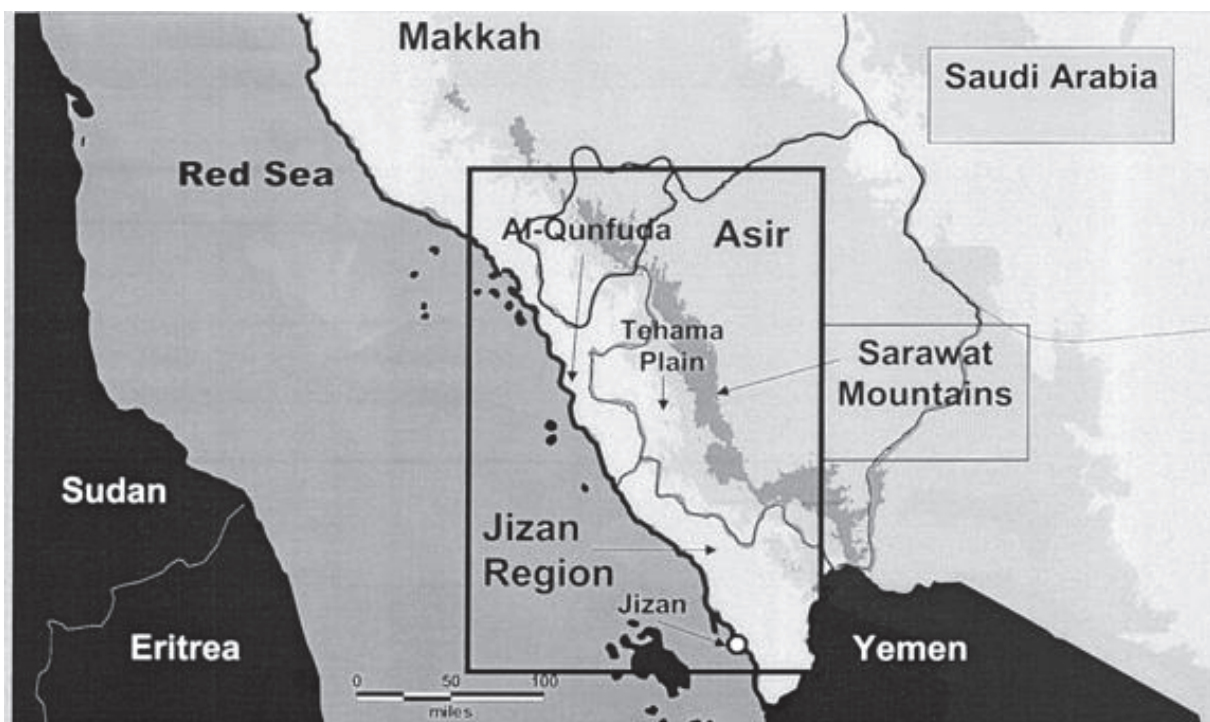
1979). Il a par ailleurs été suggéré que l'origine de cette épidémie pourrait être due au commerce d'animaux avec le Soudan voisin. En effet, le commerce des ovins, bovins mais aussi des camélidés est important entre les deux pays. Il est aussi important de noter que les camélidés ont été longtemps considérés comme porteur asymptomatique de la FVR. Ces derniers pourraient ainsi faciliter la propagation du virus et être à l'origine de l'introduction de la maladie (Corwin *et al.* 1993). Les souches isolées durant cette épidémie ont été nommées en fonction de la localisation du prélèvement effectué. Les souches les plus étudiées provenant de cette épidémie ont été isolées dans l'hôpital de Zagazig et sont nommées ZH501 et ZH548 (Meegan 1979). De façon intéressante, le séquençage de ces souches a permis de rapprocher phylogénétiquement ces deux souches RVFV des virus de l'épidémie ayant eu lieu au Zimbabwe en 1974 (Samy *et al.* 2017).

La surveillance épidémiologique de la faune domestique et sauvage permet désormais de considérer la FVR comme endémique en Egypte depuis 1978. Corwin *et al.* ont comparé les taux d'IgG dirigé contre RVFV dans les populations humaines en 1978 et en 1990 (Corwin *et al.* 1993). Chez les personnes âgées de moins de 12 ans, le taux de séroprévalence IgG anti-RVFV est estimé à 15% en 1990 comparativement à 38% en 1978, illustrant tout de même la circulation du virus après la période épidémique de 1977/78. La présence de *Culex pipens* et d'autres espèces telles que *Aedes aegypti* et *Aedes vexans*, espèces de moustiques connues pour être compétentes pour RVFV (voir paragraphe 1.3), pourrait expliquer le maintien de la transmission du virus en Egypte. En parallèle, Mroz *et al.* mettent en avant ces circulations à bas bruit chez les ruminants durant les périodes inter-épidémiques. Cette surveillance sérologique des ruminants s'est étalée sur les années 2014 et 2015 dans les régions du Delta du Nil et du Sud-Est de l'Egypte. Ces études montrent une détection moyenne d'anticorps de type IgG contre RVFV de 2,29% chez les différentes espèces de ruminants, avec 3,17% chez les camelins et jusque 5.85% chez les bovins. Les plus jeunes bovins et camelins testés étaient âgés de 3 ans ce qui montre une exposition récente de ces animaux au virus (Mroz *et al.* 2017).

#### 1.2.4 Introduction du RVFV dans la péninsule arabique

Pendant tout le XXème siècle, le RVFV n'avait été détecté que sur le continent africain. Entre le 26 aout 2000 et le 22 septembre 2001, l'Arabie Saoudite et le Yémen ont signalé la présence de 834 cas humains de FVR. Durant cette période,

deux évènements de pluviométrie importante ont eu lieu, (i) le premier évènement, d'août à octobre 2000 et (ii) le second évènement du mois d'avril au mois de juin 2001, durant la saison des pluies qui est liée au phénomène météorologique appelé El Niño (Linthicum *et al.* 1999; Logan *et al.* 1991). L'existence d'épisodes de fortes précipitations est favorable à l'émergence de grandes populations de moustiques capables de transmettre le RVFV (Jupp *et al.* 2002). Une étude a mis en évidence la présence de moustiques femelles détectées positives pour le RVFV dans la région de Jizan au cours du mois de septembre 2000. Les auteurs ont pu montrer un taux de moustiques (des genres *Culex* et *Aedes*) positif à RVFV compris entre 0.3 et 13.8 pour 1000 en fonction des sites de capture, le site d'Harub (Jizan) étant celui qui présentait le plus fort taux de positivité. Ces auteurs ont, par la suite, démontré expérimentalement, la compétence des espèces de moustiques locales à transmettre le virus (Jupp *et al.* 2002). La région du Jizan (Figure 5) a été particulièrement touchée par l'épidémie avec 683 cas humains avec plus de 75% des cas en contact important avec des animaux d'élevage et/ou des moustiques. Les éleveurs RVFV positifs ont aussi rapporté une vague d'avortements anormale chez les femelles gestantes (61,7%) et une mortalité non expliquée au sein de leurs troupeaux (51%) (Madani *et al.* 2003). Le résultat de cette étude confirme la circulation dans les élevages de la FVR ainsi qu'un fort risque de contamination humaine associé aux activités d'élevage et à l'abattage des animaux.



*Figure 5: Carte de la région du Jizan en Arabie Saoudite (Madani et al. 2003).*

L'introduction de la FVR dans la région du Jizan est probablement survenue par l'importation d'animaux infectés provenant des pays de la Corne de l'Afrique. Durant l'année 2000, soit avant la détection des premiers cas humains, la majorité des 250,505 animaux d'élevage importés en Arabie Saoudite durant la période précédant l'Aïd el-Kébir (17/03/2000) provenait de la corne de l'Afrique (Abdo-Salem *et al.* 2011). Ces animaux, originaires le plus souvent du Soudan ou du Kenya transitent généralement par la Somalie pour pouvoir rejoindre la mer Rouge. Au début de l'année 2000, la surveillance épidémiologique réalisée dans le sud de la Somalie révélait que 40% des troupeaux comprenaient des animaux avec des anticorps de type IgM dirigés contre RVFV (IgM+) indiquant une circulation récente du virus dans la Corne de l'Afrique. L'importation de ces animaux au Jizan peut donc être à l'origine de l'épidémie de 2000 (Abdo-Salem *et al.* 2011). Plus tard, une étude de séroprévalence menée par Mohamed *et al* chez les animaux d'élevage, montre une séroprévalence d'IgG de 20.83% en 2011 dans la région du Jizan. Cela montre une exposition importante des animaux au virus, avec une infection qui n'est pas forcément survenue en Arabie Saoudite. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont réalisé une étude de séroprévalence des animaux importés depuis la Corne de l'Afrique. La prévalence, cette même année, est de 17.91% d'IgG+ mais aucun IgM+ (Mohamed *et al.* 2014).

#### 1.2.5 Phylogéographie du virus de la fièvre de la Vallée du Rift

Dans le but de mieux comprendre l'histoire évolutive du RVFV, de nombreuses études phylogénétiques ont été menées et ont abouti à plusieurs propositions de classifications. Elles se basent sur la comparaison de séquences génomiques des 3 segments S, M et L du RVFV. Deux classifications se détachent, la première utilise des séquences complètes de chacun des segments alors que la deuxième est basée sur des séquences partielles (Bird *et al.* 2007; Grobbelaar *et al.* 2011)

L'approche proposée par Bird *et al* 2007 est basée sur la séquence complète de chacun des trois segments du RVFV. La méthode utilisée, dite de maximum de vraisemblance, a permis de regrouper initialement l'ensemble des souches au sein de 7 lignées nommées de A à G (Figure 6A), puis de 9 lignées (avec l'ajout des lignées H et I) à la suite des épidémies de Madagascar 2008 et du Soudan 2010. De façon intéressante, les arbres générés pour les trois segments génétiques présentent la

même topologie. Comme énoncé précédemment, cette classification nécessite de générer la séquence complète des 3 segments. Elle est limitée par le nombre de séquences disponibles dans les bases de données pour être employé. Bien souvent, les séquences complètes ne sont obtenues que pour le segment S, le plus court, d'une taille de 1690 nucléotides (nt), et, dans ce cas, l'information d'un possible réassortiment génétique entre les segments est perdue (Bird *et al.* 2007).

Une approche alternative, basée sur des séquences partielles, a été proposée par Grobbelaar et ses collaborateurs. Elle utilise 735 nt de la séquence codante de la protéine N (segment S), de 459nt de la séquence codante de la glycoprotéine Gn (segment M) et de 494nt de la séquence codante de polymérase L (segment L). Avec cette approche, les auteurs proposent une classification des souches de RVFV en 15 lignées, nommés de A à O (Figure 6B) (Grobbelaar *et al.* 2011).

Ces deux approches phylogénétiques sont comparables entre elles apportant cependant plus de détails dans un cas que dans l'autre. Prenons quelques exemples.

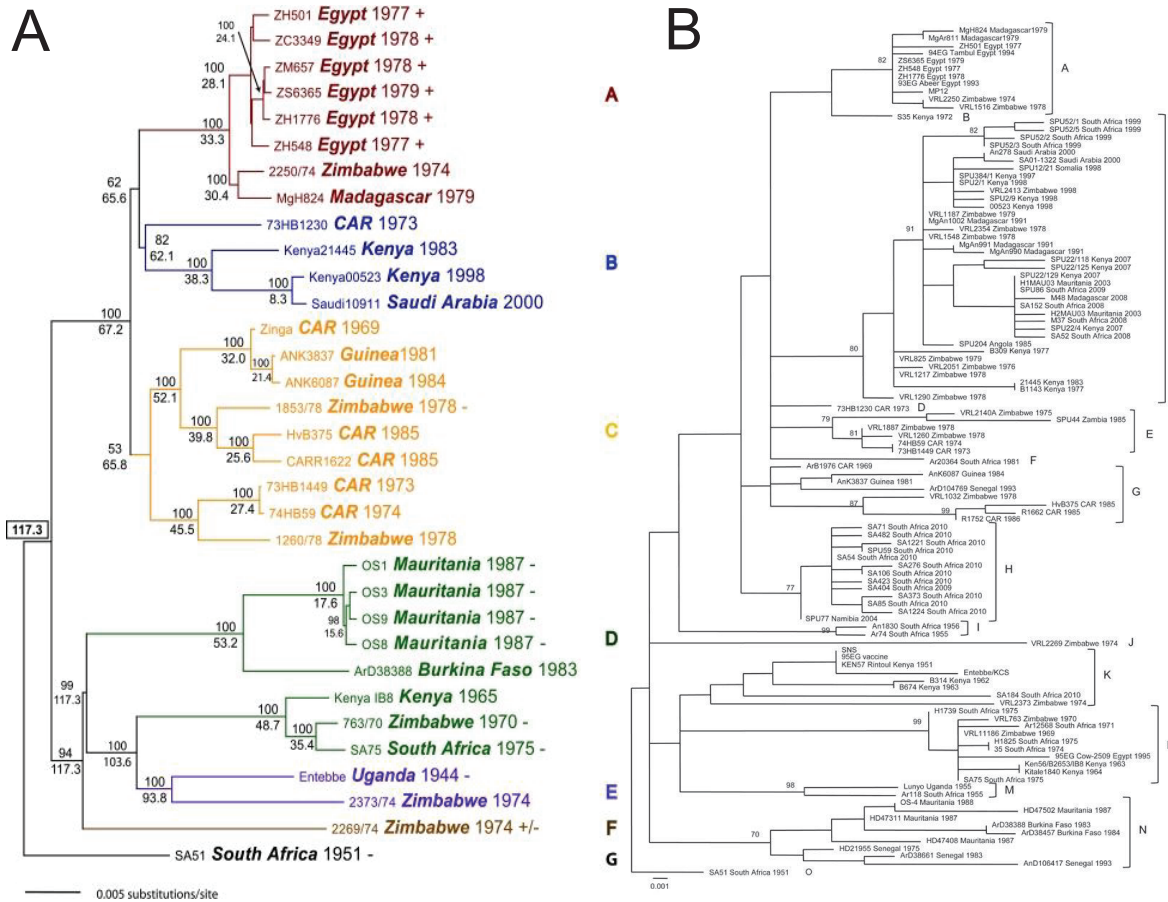
- La lignée A de « Bird » regroupe les mêmes souches que la lignée A de « Grobbelaar ». L'arbre phylogénétique sur des séquences partielles est naturellement plus fourni puisque le nombre de séquences disponibles dans les bases de données de type Genbank est plus importante qui permet d'affiner la définition des nœuds des branches des arbres.

- La lignée C de l'arbre de « Bird » correspond aux 3 lignées nommées E, F et G de « Grobbelaar ».

- La branche D de l'arbre de « Bird » est supportée par 2 nœuds, le premier donnant (a) la branche des souches d'origine Mauritanienne de 1987 (b) la seconde branche portant le nœud qui conduit vers les souches du Kenya de 1965 et d'Afrique du sud de 1975 (lignée D) ou vers les souches de la lignée E (Figure 6A). Selon cet arbre, la lignée E dérive d'un ancêtre commun avec la lignée D. Dans la classification de « Grobbelaar », le nombre de séquences permet de subdiviser la branche de la lignée D de « Bird » en 2 lignées nommées L et N, la branche E est aussi divisée en 2 lignées nommées K et M. Dans ce dernier arbre, l'hypothèse d'évolution des branches L, N, K et M à partir d'un ancêtre commun est conservé par rapport à l'arbre de



« Bird » et va plus loin en proposant l'idée d'une évolution indépendante entre la branche D et E.

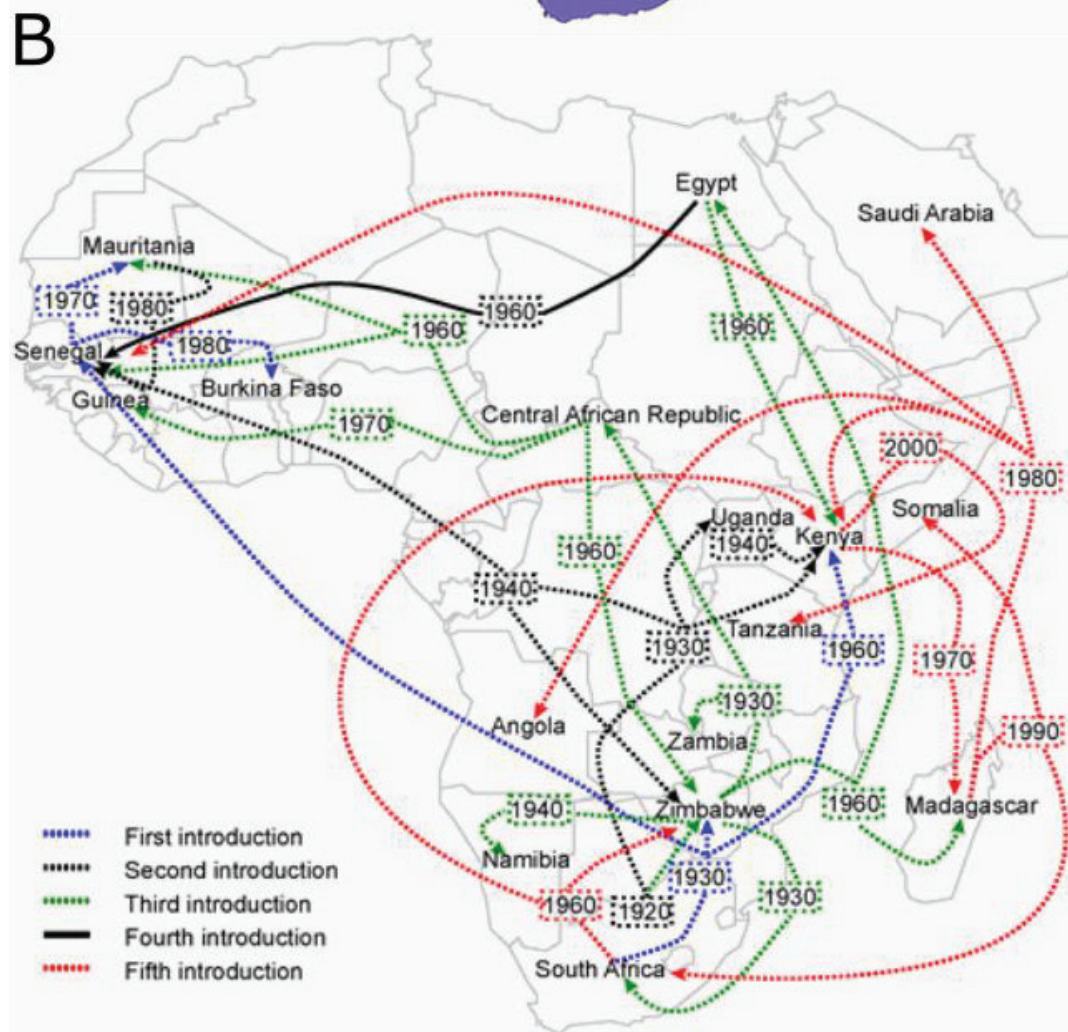
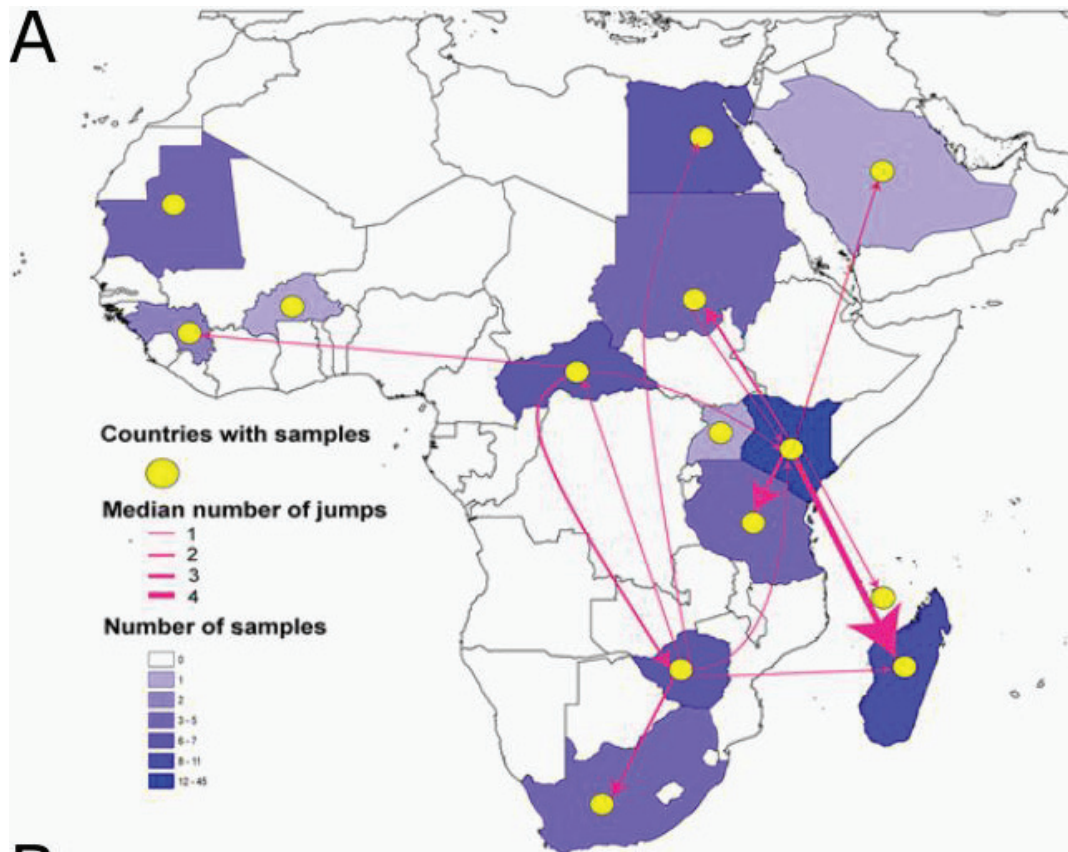


**Figure 6 :** Arbres phylogénétiques de RVFV basés sur le segment M. (A) Arbre phylogénétique basé sur le segment M complet de RVFV (Bird et al. 2007). (B) Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du segment M (490nt de la protéine Gn) (Grobbelaar et al. 2011).

L'approche de phylogéographie permettant d'étudier l'évolution des virus associe les données de suivis géographiques, temporelles et génomiques faisant intervenir des calculs de statistiques bayésiennes pour retracer l'histoire évolutive des souches, par exemple l'origine des événements d'introduction. En se basant sur les travaux de « Bird », Samy *et al* ont réalisé une première approche phylogéographique de RVFV. Cette étude a permis de mettre en lumière les mouvements du virus depuis sa détection au Kenya en 1930. Ce pays semble être à l'origine des flèches de diffusion vers les pays voisins ainsi que le Soudan et Madagascar. De façon intéressante, les auteurs ont émis l'hypothèse que le Zimbabwe serait un des points d'émergence de RVFV et aurait été à l'origine de la diffusion vers l'Afrique du Sud, Madagascar et la République Centre Africaine (RCA) (Figure 7A). Cela met aussi en avant les

événements d'introduction et de réintroduction qui provoquent l'apparition d'épizootie/épidémie importante comme en Afrique du Sud où les auteurs montrent au moins deux introductions indépendantes. Cette approche permet aussi de caractériser l'origine de RVFV en Arabie Saoudite qui proviendrait d'une importation d'animaux en provenance du Kenya (corne de l'Afrique) comme nous l'avons évoqué précédemment (Samy *et al.* 2017). Une seconde étude phylogéographique a été réalisée par Soumaré *et al* avec pour objectif d'explorer l'origine des souches ouest-africaines (Soumaré *et al.* 2012). Les auteurs ont pu mettre en évidence que l'origine du RVFV en Afrique de l'Ouest pourrait remonter à 1920 en provenance du Zimbabwe et de l'Afrique du Sud. Cette conclusion coïncide avec les propositions de Samy *et al* dans le rôle du Zimbabwe comme point d'émergence. En ce qui concerne l'Afrique de l'Ouest, les auteurs ont émis l'hypothèse que cette partie du continent a connu 5 événements d'introduction distincts sur la période de 1930 à 1980 (Figure 7B) (Soumaré *et al.* 2012).

L'étude des séquences virales employant les statistiques bayésiennes permet aussi d'analyser l'évolution virale à travers les mutations ponctuelles de chaque segment génomique du virus. Freire *et al* ont exploré l'évolution des séquences génétiques du RVFV au cours du temps, ils ont pu mettre en avant une évolution différente des 3 segments où chacun évolue à des vitesses différentes (Freire *et al.* 2015). Le segment L apparaît comme étant le plus stable, suivi du segment S puis du segment M ; ce dernier présentant une plus grande diversité qui tend à se stabiliser depuis les années 1970 (Freire *et al.* 2015; Soumaré *et al.* 2012). La différence de dynamique évolutive entre les segments génomiques a permis aux auteurs de proposer un autre mécanisme d'évolution des souches basé sur le réassortiment des segments. La possibilité de réassortiment des segments génomiques du RVFV est supportée par l'exemple du premier cas humain d'importation du virus en Chine où le patient a été infecté en Afrique du Sud en 2016 (Liu *et al.* 2017). Le virus isolé de ce patient présentait un segment M et L apparenté à la lignée E tandis que le segment S appartenait à la lignée A (classification de « Bird »). Ce cas confirme la possibilité d'évolution du RVFV par réassortiment de ces segments génomiques.



*Figure 7: Analyses phylogéographiques du RVFV pour caractériser l'origine de l'introduction du RVFV, (A) en Arabie Saoudite (Samy et al. 2017) et (B) en Afrique de l'Ouest (Soumaré et al. 2012). Les flèches relient les sources et les différentes localités touchées par les événements sanitaires de FVR. Les introductions distinctes au Sénégal et en Mauritanie sont représentées par des couleurs différentes.*

### 1.2.6 Le cas particulier de l'Afrique de l'Ouest

L'Afrique de l'Ouest est une région particulièrement intéressante pour l'étude de la FVR et des facteurs impliqués dans son émergence. Cette région a été le théâtre de multiples événements d'introduction de nouvelles souches virales de RVFV. Cinq seraient originaires (i) d'Afrique australe de 1930 ; 1940 ; 1960, (ii) d'Égypte en 1960 et (iii) de la façade orientale de l'Afrique au cours des années 1980 (Figure 7B).

La région Afrique de l'Ouest s'étend du sud de l'Algérie au Nigéria, la limite la plus orientale étant la frontière entre le Niger et le Tchad. Cette partie du continent est caractérisée par la présence de deux saisons climatiques majeures, la saison sèche d'octobre à juin et la saison humide de juin à octobre. La majorité des événements de pluie sont concentrés au sud du 20ème parallèle, caractérisé par un environnement subtropical riche en terres cultivées et en prairies. Au nord du 20ème parallèle, l'environnement est dominé par les régions désertiques de faible végétation avec des événements pluvieux plus rares (Figure 8). La frontière entre le Sénégal (SEN) et la Mauritanie (MRU) est matérialisée par le fleuve Sénégal qui crée une région humide de part et d'autre de ces rives.

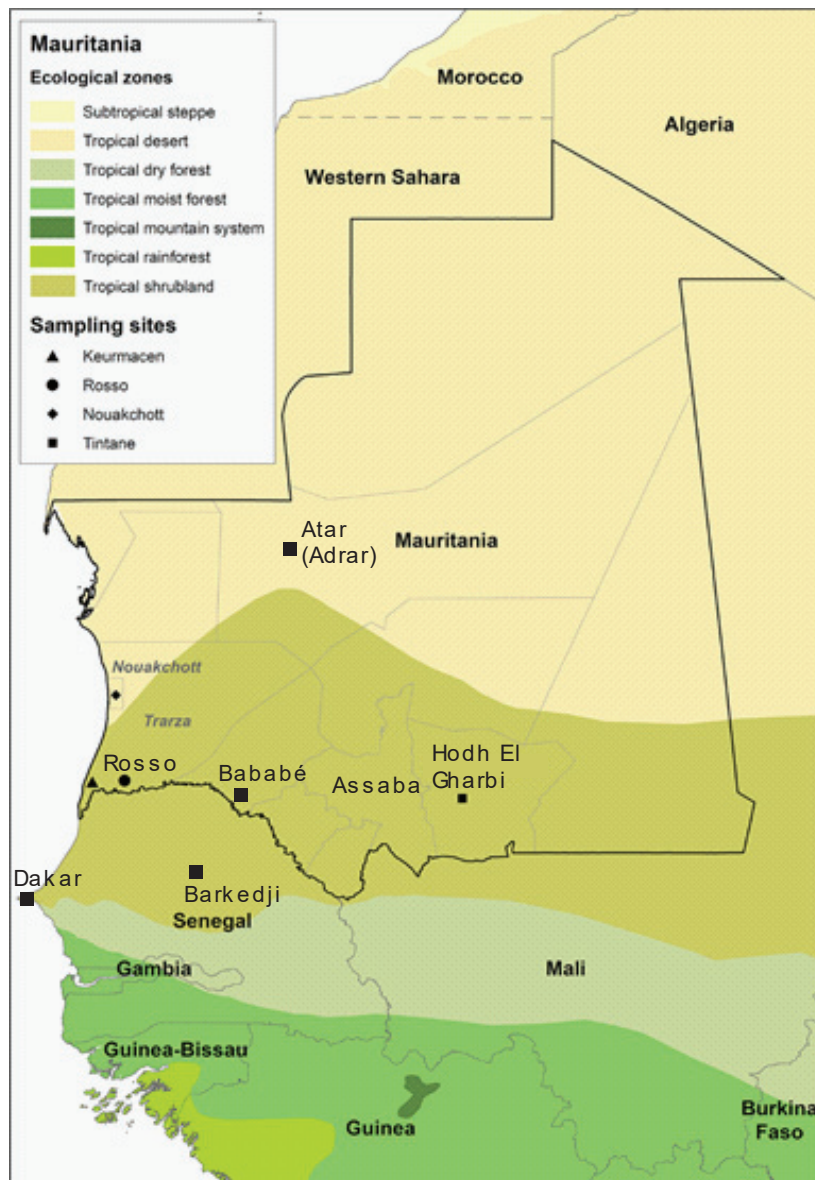


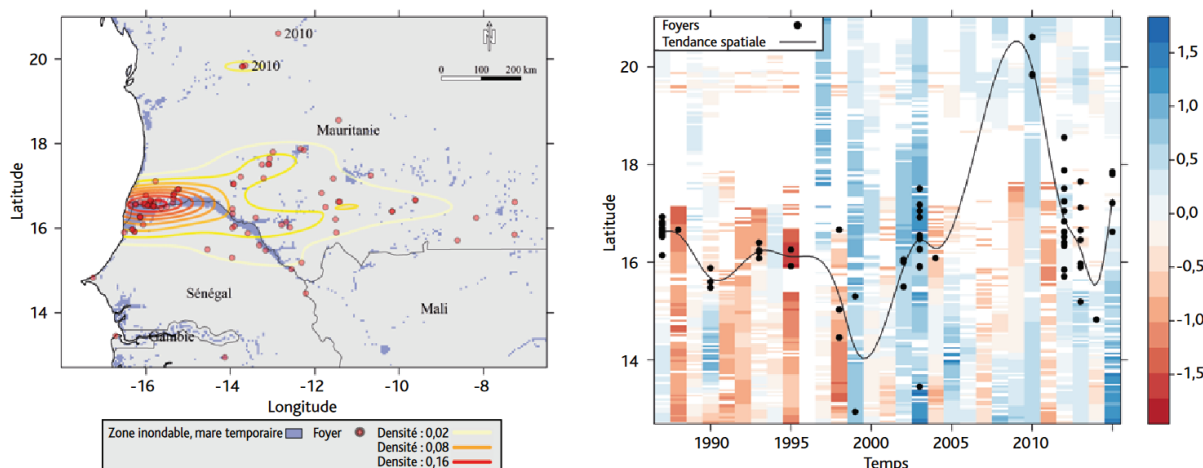
Figure 8 : Carte des zones écologiques caractérisées en Afrique de l'Ouest, de la Guinée au sud à la Mauritanie au Nord adapté des travaux de Stoek et ces collaborateurs (Stoek et al. 2022).

La première détection du RVFV en Afrique de l'Ouest s'est faite au Nigéria en 1967 à partir de deux populations d'arthropodes différentes : *Culex antennatus* et *Culicoides spp.* de façon anecdotique (Lee 1979), suivie par sa détection dans la région de Kédougou au Sénégal en 1974 chez *Aedes dalzieli*, une espèce réalisant principalement ses repas sanguins sur des ovins et/ou l'homme. L'espèce *Aedes vexans* (considérée comme l'un des vecteurs principaux de RVFV, voir paragraphe 1.3) est aussi présente dans la région de Kédougou mais le RVFV n'a pas été détecté dans cette population en 1980 (Fontenille et al. 1998).

Une surveillance sérologique a été initiée dans plusieurs pays d’Afrique de l’Ouest à la fin des années 1980 avec des taux de séroprévalence durant la période 1985 à 1987 atteignant 26.7% dans la population d’ovins, bovins et caprins au Burkina Faso et de 17.8% en Mauritanie (Akakpo *et al.* 1989). Il est intéressant de noter que deux espèces différentes de chauves-souris ont également été détectées positives pour RVFV en Guinée et que les souches ont pu être isolées ultérieurement (Bird *et al.* 2007). De façon concomitante, un premier cas humain a été détecté, en 1987, dans la ville de Rosso, située aux bords du fleuve Sénégal en Mauritanie. L’épidémie qui suivra entraînera le décès de 201 personnes (Akakpo *et al.* 1989).

Une autre étude rétrospective menée en 1988 a aussi montré une forte séroprévalence d’ovins (71,7% des sérums testés) dans la région voisine de Dagana (Mauritanie). Toutefois, ce niveau de séroprévalence a diminué l’année suivante (23.9%) (Thiongane *et al.* 1991). Une hypothèse pour expliquer la diminution de la proportion en IgG serait le renouvellement des populations de ruminants. Le séquençage des différentes souches isolées durant cette épidémie montre qu’elles appartiennent à la lignée D (Bird *et al.* 2007) et auraient été importées en Afrique de l’Ouest durant le premier événement d’introduction en 1930 (Figure 7B).

Après l’année 1987, le virus a été à l’origine de plusieurs épizooties et épidémies jusqu’en 2015 de façon récurrente (Figure 9). Toutefois ces événements, dont la majorité sont localisés autour du fleuve Sénégal, ne semblent pas être intimement liés à la pluviométrie comme cela pourrait être le cas en Afrique de l’Est (Figure 9) (Arsevska *et al.* 2016) puisque les événements épidémiques surviennent autant durant les années de faible et de forte pluviométrie.



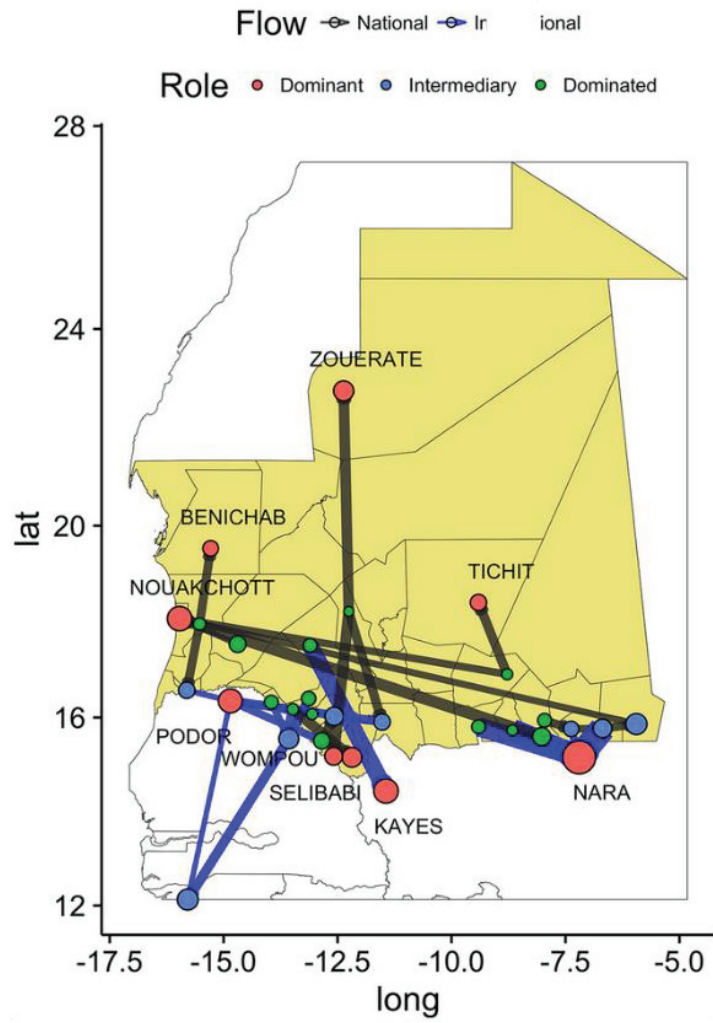
**Figure 9 : Carte présentant les foyers épidémiques et épizootiques au Sénégal et en Mauritanie au cours du temps et en fonction de la pluviométrie annuelle (Arsevskia et al. 2016).**

Les échanges commerciaux et la transhumance d’animaux d’élevage est intense en Afrique de l’Ouest et particulièrement entre le Sénégal et la Mauritanie (Figure 10A) (Jahel *et al.* 2020). Comme indiqué précédemment, la mobilité animale est un des facteurs clés de l’émergence et de la diffusion de la FVR dans de nouvelles zones géographiques. Ces migrations sont accentuées dans la période qui précède l’Aïd El-Kébir aussi appelé Tabaski, qui est une fête religieuse constituant un événement social majeur, marqué par le rite sacrificiel d’un animal qui sera ensuite partagé et consommé par la communauté. Les ovins sont les animaux majoritairement déplacés pour la Tabaski bien que les caprins, les bovins et les camélidés le soient aussi. En 2014, Jahel et ses collaborateurs ont étudié les mouvements des animaux d’élevage au Sénégal et en Mauritanie. Ils ont pu mettre en évidence une interface d’échange importante entre la Mauritanie et le Sénégal à la frontière qui s’étend, d’ouest en est, de la région de Rosso à celle de Diawara, et ce quelle que soit la saison (sèche ou humide). Au Sénégal, la région de Barkedji semble être un nœud de transhumance important qui fait le lien entre le Nord et les régions de Dakar à l’Ouest et de Kédougou au Sud/Est. En Mauritanie, les routes les plus empruntées sont celles qui traversent le pays d’Est en Ouest dans sa partie sud et qui relie Nara à la capitale Nouakchott. Cette route se croise avec celle qui traverse le pays du sud au niveau de la région du fleuve Sénégal et le Nord de la région de l’Adrar (Figure 10A) (Arsevskia *et al.* 2016). Cette route Nord/Sud est importante dans les interactions avec les marchés au Sénégal. Il est intéressant de noter que les troupeaux de petits ruminants et de camélidés emprunte les deux grandes routes de circulation

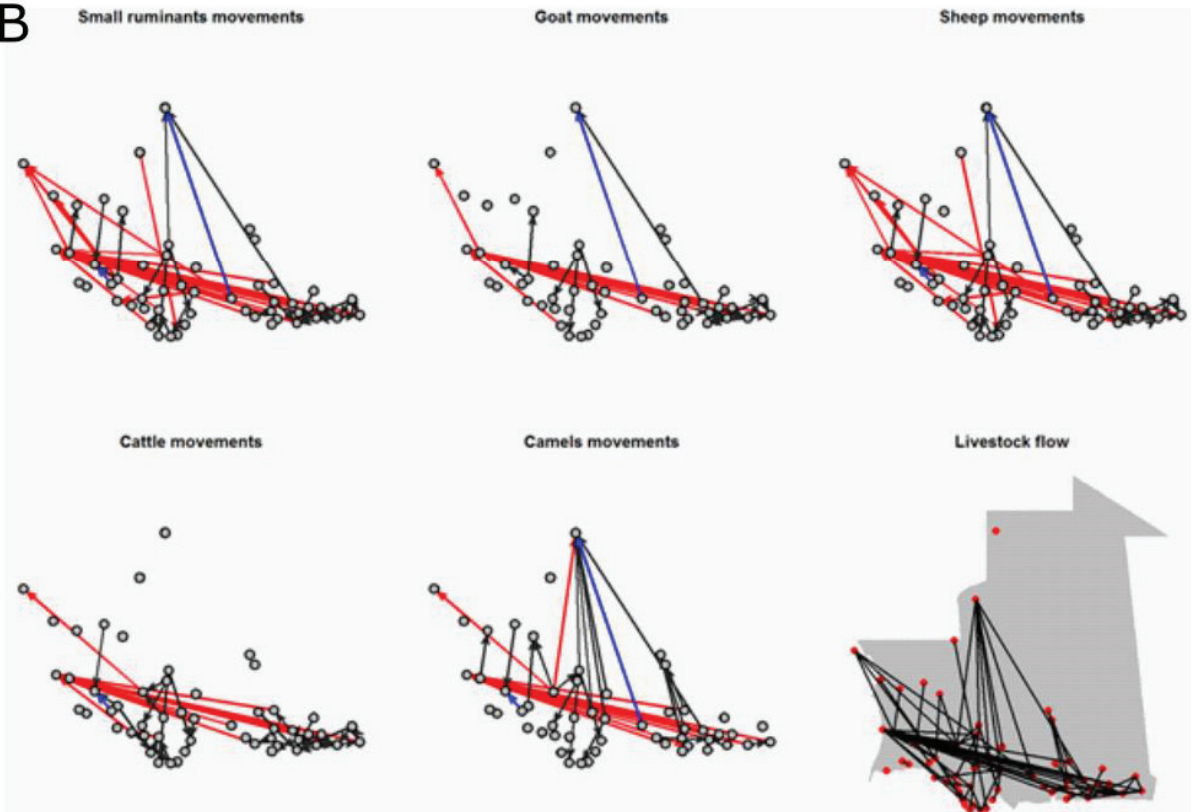
contrairement aux moutons, aux chèvres et aux bovins qui montre une circulation principalement d'Est en Ouest ( Figure 10B). Il est aussi important de souligner que les éleveurs ont de fortes probabilités de partir en transhumance pendant la période sèche pour rejoindre des terres fertiles en pâturages afin d'alimenter le bétail. Ces mouvements de bétail permettent aussi d'initier certains échanges commerciaux.



A



B



**Figure 10 : Carte des interactions et de la mobilité animale.** (A) Interactions entre différents marchés de Sénégal et Mauritanie sous la forme d'une carte des flux migratoires globaux entre le Sénégal et la Mauritanie (Apolloni et al. 2018). (B) Carte des flux migratoires des petits ruminants, chèvres, moutons, bovins et dromadaires en Mauritanie (Nicolas et al. 2018).

La région de Barkedji (SEN) pourrait être la porte d'entrée du virus pour 3 événements d'introduction différents à travers le Sénégal et la Mauritanie (Soumaré et al. 2012). De plus, l'introduction de la FVR dans la région de l'Adrar (MRU) pourrait être expliquée par les mouvements d'animaux d'élevage vers cette région grâce à la route rejoignant le Nord du pays. Selon les travaux de Jahel et al, les camélidés et les petits ruminants ont une forte probabilité d'emprunter cette route. L'hypothèse que la mobilité de ces cheptels puisse jouer un rôle dans l'émergence du RVFV dans la région de l'Adrar (MRU) est émise (Jahel et al. 2020). En 2010, la pluviométrie importante dans cette région de l'Adrar, et plus précisément dans l'Atar, a été à l'origine de l'apparition de nouveaux oasis et d'étendues d'eaux stagnantes favorables à la pullulation de différentes espèces de moustiques (El Mamy et al. 2014). La présence de ces étendues d'eau rassemble une forte densité d'animaux d'élevage permettant leurs abreuvements ainsi que des représentants de la faune sauvage tels que des gazelles illustrant une interface vecteur-hôte favorable à la dissémination du RVFV. Dans ce contexte, cette région fut l'épicentre de l'épidémie de FVR survenue en 2010 avec une forte séroprévalence d'anticorps anti-RVFV de type IgM, atteignant 46% chez les petits ruminants (El Mamy et al. 2011). Cette région aride du nord de la Mauritanie a aussi la particularité d'avoir une population importante de camélidés qui présentait également une séropositivité au RVFV de 36% (El Mamy et al. 2011). Les camélidés étaient, jusqu'à cette épidémie, considérés comme porteurs asymptomatiques de la FVR (Scott et al. 1963), c'est-à-dire présentant peu à pas de symptômes. Cependant, en 2010, des formes symptomatiques sévères (similaires à celles observées chez d'autres espèces de ruminants infectés) ont été observées chez les camélidés avec des conjonctivites, des saignements au niveau des gencives, des lésions aux pattes, des avortements chez les femelles gestantes ainsi qu'une léthalité pouvant survenir quelques jours après l'apparition de ces symptômes (El Mamy et al. 2011). Certains dromadaires ont également développé une forme aiguë très sévère de la maladie conduisant à la mort de l'animal en moins de 24h (El Mamy et al. 2011). Un total de 63 cas humains et 13 décès ont été rapportés. L'isolation du virus à l'origine de cette épidémie et son séquençage ont permis de mettre en avant la proximité phylogénétique de cette

souche avec celle isolée à Kakamas (Afrique du sud) en 2009 (El Mamy *et al.* 2014). Plusieurs souches ont pu être isolées à partir de ces foyers cliniques. L'une d'entre elles, nommée MRU25010-30 et isolée à partir du sérum d'une dromadaire, est une des deux souches étudiées au cours de cette thèse. Cette épidémie a précédé une période de forte activité de la FVR au Sénégal et en Mauritanie. En 2012, le sud de la Mauritanie a été touché par une épidémie qui fut à l'origine de 41 cas humains entraînant 13 décès humains. Le niveau de séroprévalence après cette épidémie de 2012 montre que 15,4% des ovins et 32% des camélidés testés étaient positifs (Rissmann *et al.* 2017). La circulation a été supportée par l'importante pluviométrie de 2012 dans le sud de la Mauritanie (Caminade *et al.* 2014). Le séquençage partiel des souches à l'origine de cette épidémie montre une forte homologie avec la souche à l'origine de l'épidémie de 2010 (Sow *et al.* 2014).

En 2013 et 2014, de nouveaux foyers épizootiques de FVR ont été décrits au nord du Sénégal et dans le sud de la Mauritanie avec des vagues importantes d'avortements chez les petits ruminants et des conséquences majeures pour les élevages touchés (Sow *et al.* 2016). Il est intéressant de noter que cette épidémie s'est déclenchée durant la fête religieuse de l'Aid El Kébir ou Tabaski qui s'est déroulée en 2013 au mois d'octobre, fête qui est généralement associée à une forte mobilité animale. De cette épizootie, plusieurs souches ont pu être isolées. L'une d'entre elles, nommée MRU2687-3, isolée à partir du foie d'une chèvre de la région de Bababé a également été étudiée durant cette thèse. L'analyse phylogénétique des différentes souches virales isolées durant cette épidémie de 2013-14 montre leurs proximités avec la souche égyptienne ZH548 isolée en 1977 et une appartenance à la lignée A. Ceci diffère des souches virales de 2010 et 2012 qui sont apparentées à la lignée E (Sow *et al.* 2016). De 2013 à ce jour, deux autres épidémies ont eu lieu (2015 et 2020) (Stoek *et al.* 2022). La plus récente, en 2020, s'est déroulée dans le sud de la Mauritanie entre les mois de septembre et de novembre, avec un total de 75 cas humains confirmés, dont une majorité étaient des éleveurs. Chez les petits ruminants et les camélidés, la prévalence d'anticorps anti-RVSV oscille entre 17,29% et 39,5% selon les régions testées selon l'organisation mondiale de la santé. Le séquençage des segments S des souches virales circulants à cette période montre qu'elles sont apparentées aux souches de 2013 et 2015 (Barry *et al.* 2022a).

En conclusion, l'activité de la FVR en Afrique de l'Ouest et les épidémies successives de plus ou moins grande envergure depuis 1987 résultent donc de différents événements d'introduction du virus au cours du temps. La diffusion de la maladie a été facilitée par une mobilité animale accrue (e.g. échanges commerciaux, fêtes religieuses) et des événements pluviométriques particuliers. Enfin, les données phylogénétiques ont montré une circulation de différentes lignées génétiques de RVFV en Afrique de l'Ouest.

### 1.3 Transmission de la FVR

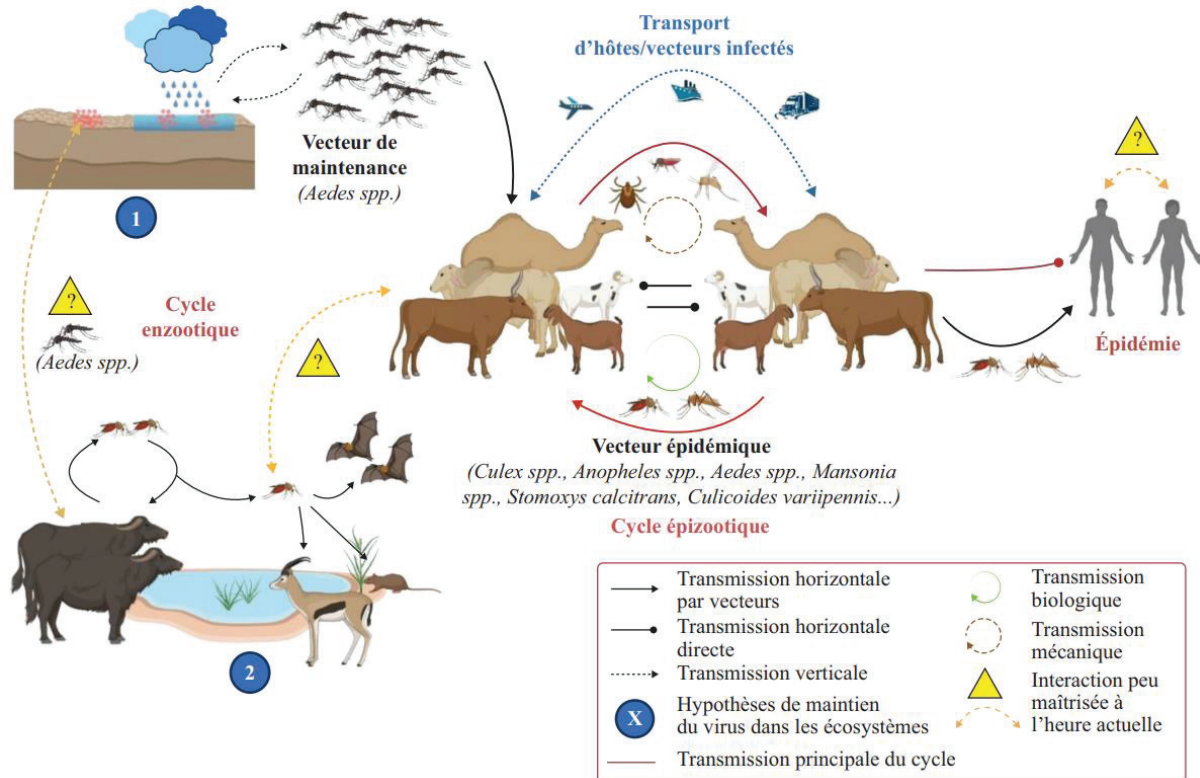
#### 1.3.1 Cycles de transmission

La FVR est une arbovirose et une zoonose. Le RVFV possède un large spectre d'hôtes mammifères et est potentiellement transmis par de nombreux arthropodes bien que les moustiques représentent son vecteur principal.

L'étude des interactions entre le virus, les vecteurs et les hôtes mammifères est indispensable pour comprendre la dynamique de transmission de la maladie. Deux cycles de transmission sont décrits à ce jour : (i) un cycle enzootique où les populations de moustiques peuvent transmettre le RVFV aux ruminants de la faune sauvage qui pourra alors être amplifié dans ces hôtes vertébrés avant de pouvoir être transmis à nouveau à des moustiques du genre *Aedes* (Figure 11). Ce cycle enzootique au sein de la faune sauvage est en lien avec le second cycle d'amplification (ii) le cycle dit épizootique avec une transmission du RVFV aux animaux d'élevage susceptibles à l'infection par le RVFV tels que les ovins, les bovins ou les caprins. Ce cycle implique plus d'espèces d'arthropodes. De nombreuses études des interactions entre le virus et des populations de vecteurs hématophages ont permis de montrer que plusieurs espèces sont compétentes pour transmettre le RVFV, c'est à dire capables d'être infectées et de transmettre le RVFV. Les principaux vecteurs de la FVR sont des moustiques, des genres *Aedes* (Ae), *Culex* (Cx) et *Anopheles* (An) (Tantely *et al.* 2015). Ces trois genres regroupent un grand nombre d'espèces différentes parmi lesquelles on retrouve *Ae. vexans* ou *Cx. pipiens* (Drouin *et al.* 2022; Gomes *et al.* 2013).

La transmission du RVFV à l'homme est encore mal caractérisée, toutefois elle survient généralement durant la période d'épizootie et peut intervenir par deux voies, soit par la voie majoritaire de contact avec les animaux infectés via les tissus

ou fluides corporels contaminés, soit par le biais des vecteurs. Ce sont essentiellement les éleveurs, les vétérinaires et les personnels des abattoirs qui sont les plus exposés au virus. Entre ces épizooties/épidémies, le virus peut circuler à bas bruit sans déclencher un nombre important de cas, on parle alors de période inter-épidémique (Quellec *et al.* 2021).

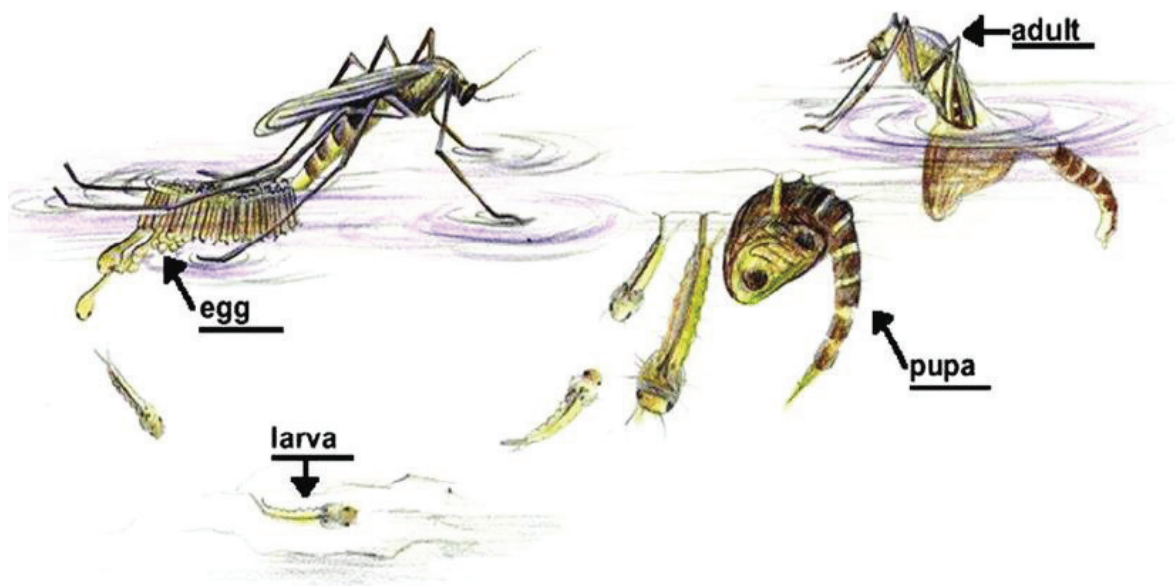


**Figure 11 : Représentation schématique du cycle de transmission biologique du RVFV (Quellec *et al.* 2021).** Au sein du cycle enzootique, il existe deux hypothèses du maintien du virus dans l'environnement entre les épidémies : (1) par transmission verticale et oviposition chez certaines espèces de moustiques principalement du genre *Aedes* (vecteur de maintenance), et/ou (2) par l'existence d'un cycle sylvatique entre une ou plusieurs espèces animales réservoirs et certaines espèces de moustiques vectrices. La source d'infection des élevages de ruminants peut être d'origine environnementale (pullulation des vecteurs) ou anthropique (mouvements de populations). La transmission du virus au sein des élevages par des vecteurs arthropodes permet l'amplification du virus puis l'établissement du cycle épizootique. La transmission du virus à la population humaine à partir d'élevages infectés (contact, aliments crus, vecteurs) déclenche une épidémie.

### 1.1.1 La circulation du RVFV pendant la période inter-épidémique

L'étude de la circulation du RVFV pendant la période inter-épidémique a permis de mettre en avant un phénomène important dans le maintien du virus notamment au Kenya et en Afrique du Sud. Linthicum *et al* émettent l'hypothèse d'une transmission verticale à partir des données issues de la capture d'*Aedes spp* pendant les périodes inter épidémiques. Cela implique un passage de la barrière trans-ovarienne par le

virus, avec la ponte d'œufs infectés par le RVFV par les moustiques adultes infectés. Cette transmission verticale permet au virus de se maintenir dans les œufs durant les périodes sèches et pourrait être à l'origine de certaines émergences/réémergences de la FVR (Linthicum *et al.* 1985). Les deux genres de moustiques *Culex* et *Aedes* ont besoin d'un point d'eau stagnante pour permettre aux femelles de pondre leurs œufs qui éclosent en 48 heures en moyenne. Ensuite, les larves évoluent vers le stade adulte en 10 jours environ en passant par le stade de pupes (Figure 12). Si le site de ponte s'assèche avant que les œufs n'éclosent, ils pourront subir une phase de dessiccation allant jusqu'à 8 mois et éclore en présence d'humidité, ce phénomène n'a été décrit que pour les moustiques du genre *Aedes*. Cette capacité de dessiccation permet donc la survie des moustiques en inter-épidémie et dans l'environnement (Hopp et Foley 2001). Seufi *et al* ont détecté au Soudan en 2007 des larves et des adultes *Ae. aegypti* non-gorgés et positifs au RVFV, soutenant ainsi l'hypothèse d'une transmission verticale du RVFV chez cette espèce (Seufi et Galal 2010). Récemment, ce mécanisme de transmission verticale a aussi été mis en évidence chez *Cx pipiens* soulignant pour la première fois que les *Aedes* ne sont pas les seuls moustiques à pouvoir transmettre verticalement le RVFV (Bergren *et al.* 2021). Au regard de l'écologie des moustiques du genre *Culex*, le rôle de ces derniers dans l'émergence de la maladie reste encore à explorer même si, en période épidémique, ce phénomène pourrait participer à l'amplification de la transmission du virus. Concernant les moustiques du genre *Anopheles*, il regroupe 430 espèces qui possèdent un cycle de vie proche des *Culex* et des *Aedes*. Les œufs pondus éclosent au bout de 2 à 3 jours toutefois ils ne sont pas résistants à la sécheresse (Williams et Pinto 2012). La transmission verticale n'a pas été démontrée de façon expérimentale en laboratoire, toutefois la collecte de larves et de pupes d'*An gambiae* au Soudan en 2007 a permis de mettre en évidence la présence dans la nature de larves et de pupes positives pour le RVFV. Ce résultat de collecte laisse donc supposer que les moustiques du genre *Anopheles* pourraient, comme les moustiques *Aedes* et *Culex*, permettre une transmission verticale du RVFV (Seufi et Galal 2010).

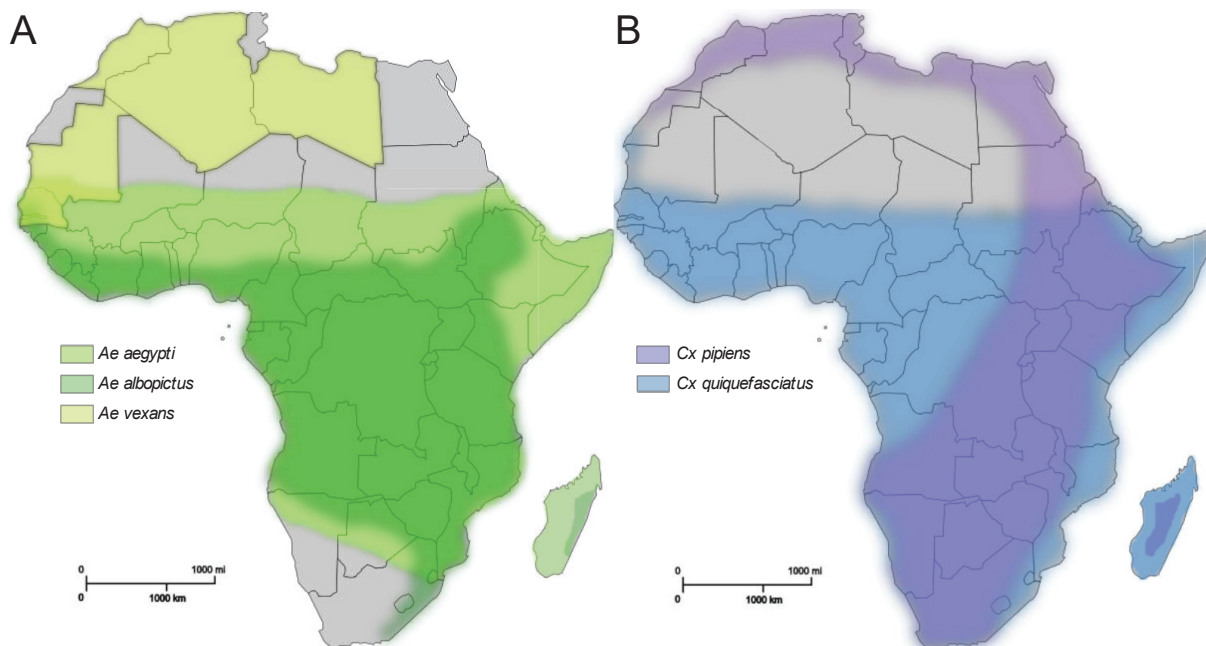


**Figure 12 : Cycle de vie du moustique (Baranitharan Ph D 2018).** Les femelles pondent les œufs dans un environnement favorable pour leurs éclosions. La larve issue de l'éclosion de l'œuf se développe pour atteindre le stade de pupa. Durant ce dernier stade, le moustique subit des transformations importantes de son organisme pour atteindre la forme adulte capable de vol et de reproduction.

### 1.1.2 Les principales espèces de moustiques vectrices du RVFV

Parmi les espèces au sein du genre *Aedes*, *Ae aegypti* est l'une des espèces les plus abondantes avec l'espèce *Ae vexans*. Ces deux espèces sont présentes sur le continent Africain mais aussi en Amérique, en Europe et en Asie (Kraemer *et al.* 2019). En Afrique, ces deux espèces sont distribuées dans toute la partie subsaharienne c'est-à-dire du Sénégal et de la Mauritanie jusqu'à l'Est de l'Afrique et Madagascar ainsi qu'en Afrique du Sud (Figure 13A) (Kraemer *et al.* 2019; Mondet *et al.* 2005). Ces deux espèces ont cependant des niches écologiques différentes. En effet, *Ae aegypti* se nourrit durant la journée majoritairement sur l'Homme et reste principalement en intérieur avec un habitat plutôt urbanisé. L'espèce *Ae vexans* est connue pour être très compétente pour la transmission du RVFV (Figure 13A) (Ndiaye *et al.* 2016). Elle est aussi présente en Afrique de l'Ouest et en particulier au Sénégal et en Mauritanie (Fall *et al.* 2012). *Ae vexans* réalise ces repas sanguins majoritairement sur des hôtes mammifères, et de par sa localisation dans un environnement principalement rural, le mode d'alimentation de cette espèce se fait principalement chez les ruminants (ovins, bovins et caprins) (Biteye *et al.* 2019). Cette espèce pourrait donc jouer un rôle dans la dynamique de circulation du RVFV

en milieu rural, plus particulièrement au niveau des points d'eaux des régions traversées par les troupeaux transhumants.



**Figure 13 : Carte de répartition de certaines espèces de moustiques vecteurs du RVFV en Afrique. (A) Carte de la répartition des espèces *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* (adaptée des données de (Kraemer et al. 2015) et *Ae. vexans* (WRBU)). (B) Carte de la répartition des espèces *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* de 2010 (adaptée des travaux (Farajollahi et al. 2011)).**

Le genre *Culex* (*Cx.*) comprend de nombreuses espèces de moustiques toutefois, deux espèces en particulier sont décrites comme compétentes pour transmettre le RVFV, ce sont les espèces *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* (Vloet et al. 2017; Ndiaye et al. 2016). *Cx. quinquefasciatus* est présent dans les régions intertropicales du globe. En Afrique, cette espèce a pu coloniser les territoires du sud du Sahara jusqu'en Afrique du Sud (Figure 13B). On retrouve aussi la présence de *Cx. quinquefasciatus* au sud de la péninsule arabique, où se trouve la région du Jizan (Farajollahi et al. 2011) mais aussi en Afrique de l'Ouest et plus particulièrement au Sénégal et en Mauritanie (Stoek et al. 2022). *Cx. pipiens* a, quant à lui, une aire de répartition plutôt centrée sur l'Amérique du nord et l'Eurasie (Ciota et Kramer 2013). Cette espèce est aussi présente en Afrique majoritairement en Afrique de l'Est ainsi que dans le pourtour méditerranéen (Figure 13B) (Farajollahi et al. 2011). *Cx. pipiens* a aussi pu coloniser des environnements aux climats plus tempérés puisque Hesson et al les ont détectés en Suède (Hesson et al. 2011). Ces deux espèces sont zoophiles



et sont capables de se nourrir sur les ruminants domestiques ainsi que les oiseaux et les humains. Leur présence dans des environnements urbanisés comme en Suède ainsi que dans des environnements plus ruraux comme la Vallée du Ferlo (SEN) et leur spectre d'hôte en font des vecteurs intéressants pour le RVFV (Farajollahi *et al.* 2011).

## 1.2 La fièvre de la Vallée du Rift

### 1.2.1 Chez les mammifères ruminants domestiques

La première description de la FVR en 1930 fait état d'un syndrome aigu chez le mouton induisant d'importantes lésions hépatiques et une forte mortalité chez les jeunes agneaux (Daubney *et al.* 1931). Au cours des années et des épidémies successives, l'étude de la FVR a permis de montrer que de nombreuses espèces animales sont susceptibles à l'infection par le RVFV, avec des signes cliniques plus ou moins prononcés. Parmi les espèces susceptibles, on trouve les ovins, les bovins et les caprins qui présentent souvent les formes symptomatiques les plus sévères surtout chez les jeunes individus. Les études de séroprévalence montrent que les camélidés sont capables d'être infectés mais ce n'est qu'en 2010 que des formes symptomatiques sévères sont décrites en Mauritanie dans cette espèce. D'autres espèces animales sont aussi infectées par le RVFV telles que certaines espèces de chauve-souris (Bird *et al.* 2007). Dans la partie suivante, nous nous concentrerons sur les ruminants domestiques qui sont les animaux les plus sensibles à l'infection afin de mieux comprendre et décrire la pathologie induite par le RVFV.

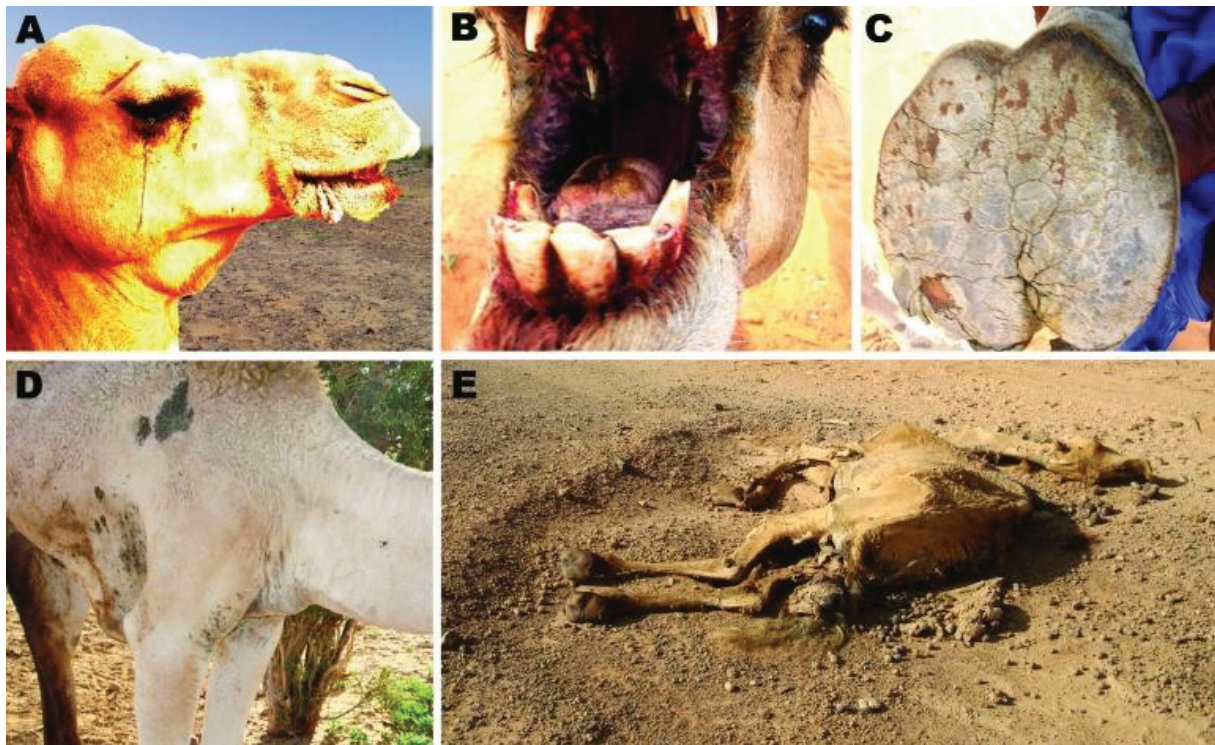
Chez les ruminants, les formes aiguës et sévères sont plus fréquentes chez les jeunes animaux (Faburay *et al.* 2016; Wichgers Schreur *et al.* 2020). Par exemple, chez les jeunes agneaux, la FVR peut entraîner une léthalité allant jusqu'à 90% avec une première phase où la maladie se caractérise par une fièvre importante (39 à 40°C) et une anorexie (Erasmus et Coetzer 1981). Des études anatomopathologiques ont montré des atteintes hépatiques caractérisées par une hypertrophie avec des foyers nécrotiques et hémorragiques pouvant conduire à des hépatites fulminantes (Erasmus et Coetzer 1981). Les poumons peuvent aussi être congestionnés provoquant des difficultés respiratoires. La rate est également atteinte avec l'apparition d'hémorragies. L'estomac et le tractus digestif peuvent également présenter des saignements et des hémorragies. Bien que les hépatites associées à

une fièvre hémorragique soient prépondérantes lors de la maladie, des atteintes neurologiques peuvent aussi observées et associées à l'apparition de lésions au niveau de la cornée la rendant opaque ; ce symptôme est appelé « œil bleu » (Busquets *et al.* 2010). Dans leur étude, les auteurs ont observé ce symptôme chez 18% des animaux infectés par le RVFV. Peu d'études ont été menées sur le RVFV *in vivo* chez les petits ruminants mais certaines données sur la virémie chez le mouton sont disponibles. Par exemple, Weingartl *et al* ont montré expérimentalement que le virus pouvait être détecté durant 5 jours avec un pic virémique au 1er et 2ème jour post-infection et atteignant un titre de 6 log<sub>10</sub> PFU/mL (Plaque Forming Unit par millilitre) (Weingartl *et al.* 2014; Busquets *et al.* 2010).

Une des caractéristiques les plus importantes de l'infection par RVFV est le phénomène de tempête abortive. Ces vagues d'avortements au sein des troupeaux sont d'ailleurs le premier signe alertant vers une suspicion et à la détection d'une épizootie de FVR. En effet, lors d'une épizootie de RVFV, jusqu'à 100% des femelles gestantes d'un troupeau d'ovins et de brebis peuvent avorter de façon spontanée. L'avorton et son placenta présentent généralement une charge virale très élevée. Oymans *et al* ont étudié la virémie chez le fœtus de mouton à un tiers ou la moitié de la période de gestation. Les animaux gestants ont été infectés par voie intraveineuse à l'aide d'une dose de 10<sup>3</sup> PFU (Plaque Forming Unit) de la souche ZH501, la virémie du fœtus a été mesurée au cours du temps, ceux-ci présentaient tous un pic au 3ème jour avec en moyenne un titre de 6 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/mL (Oymans *et al.* 2020). Cette donnée est importante car l'exposition d'autres animaux ou d'hommes à une charge virale si importante peut entraîner leurs contaminations (Ross *et al.* 2012).

Les camélidés (principalement des dromadaires ainsi que certaines espèces de chameaux du moyen orient) peuvent être infectés par le RVFV avec une séroprévalence qui a pu atteindre 45% en 1962 (Scott *et al.* 1963). Ils sont généralement asymptomatiques et donc considérés comme un réservoir potentiel du virus (Scott *et al.* 1963). Néanmoins, au cours d'une épidémie qui a touché la Mauritanie en 2010, des formes symptomatiques sévères parfois léthales de la FVR sont apparues chez les camélidés (El Mamy *et al.* 2011). Les animaux infectés présentaient des signes cliniques (Figure 14) tels que des conjonctivites, des œdèmes

au niveau de la gorge associés à des saignements. Des avortements spontanés de femelles gestantes ont également été rapportés.



**Figure 14 : Singe** Signes cliniques observées chez les dromadaires durant une l'épidémie de RVFV en Mauritanie, en 2010 en Mauritanie (El Mamy *et al.* 2011). A) Conjonctivite et écoulement oculaire, hémorragies des gencives et œdème de l'auge ; B) hémorragies des gencives et de la langue ; C) lésions des pieds (fissures de la sole) avec myase secondaire ; D) œdème à la base du cou ; E) dromadaire mort avec avortement, convulsions et courbure du cou.

### 1.1.1 Chez l'Homme

Chez l'Homme, l'infection par le RVFV par une exposition aux fluides corporels d'animaux contaminés est à présent clairement établie. Cela peut se produire durant l'abattage des animaux, la découpe des carcasses ou les soins prodigués aux animaux notamment lors de la mise-bas. De ce fait, les premières personnes exposées au RVFV sont les éleveurs, les vétérinaires et les personnels des abattoirs. La consommation de lait cru peut également être une source d'infection (Grossi-Soyster *et al.* 2019). L'infection par le RVFV peut aussi provenir de l'exposition aux piqûres par les vecteurs arthropodes. L'infection par voie vectorielle a ainsi permis d'expliquer un certain nombre de cas de FVR humains lors de l'épidémie survenue à Mayotte en 2018-2019. Sur cette période, plusieurs personnes exposées aux piqûres de moustiques ont présenté des formes symptomatiques de FVR sans pour autant avoir été en contact avec des animaux. La modélisation réalisée par Métras *et al* propose

une possible origine vectorielle pour environ 50% des cas humains de FVR recensés (Métras *et al.* 2020). La transmission interhumaine n'a pas été documentée à ce jour (Hartman 2017). La majorité des patients développent une infection peu ou pas symptomatique. Les formes bénignes de l'infection sont caractérisées par l'apparition d'un syndrome fébrile « dengue-like », avec des maux de tête, de nausées, des douleurs articulaires ainsi que de la fièvre accompagnée de tremblements et de douleurs abdominales (Sabin et Blumberg 1947; Daubney *et al.* 1931). Les signes cliniques observés n'étant pas spécifiques, le diagnostic de la FVR est difficile et peut être confondu avec d'autres arboviroses. Le temps d'incubation de la FVR chez l'Homme est de 4 à 6 jours avant l'apparition des symptômes. Cependant, durant cette période certaines personnes vont développer des formes plus sévères parfois mortelles avec une atteinte hépatique entraînant des lésions nécrotiques et des saignements pouvant provoquer le décès du patient (Figure 15).

Un à trois jours après la retombée de la fièvre, les patients peuvent développer un nouvel épisode fébrile associé à des maux de tête importants. Cette phase plus tardive peut s'aggraver sous une forme neurologique et/ou thrombopénique (Figure 15). Cette forme neurologique tardive est à l'origine de lésions dans l'encéphale et au sein du centre de la vision induisant une cécité partielle voire complète. La cécité peut aussi arriver à la suite de l'infection de la rétine entraînant ainsi une rétinite. Les lésions neurologiques peuvent aussi provoquer des convulsions souvent associées à une méningite et/ou encéphalite qui peuvent engager le pronostic vital du patient (Mundel 1951; Sabin et Blumberg 1947). La forme thrombopénique commence, quant à elle, par l'apparition de douleurs aux jambes durant la seconde phase fébrile (Ikegami et Makino 2011).

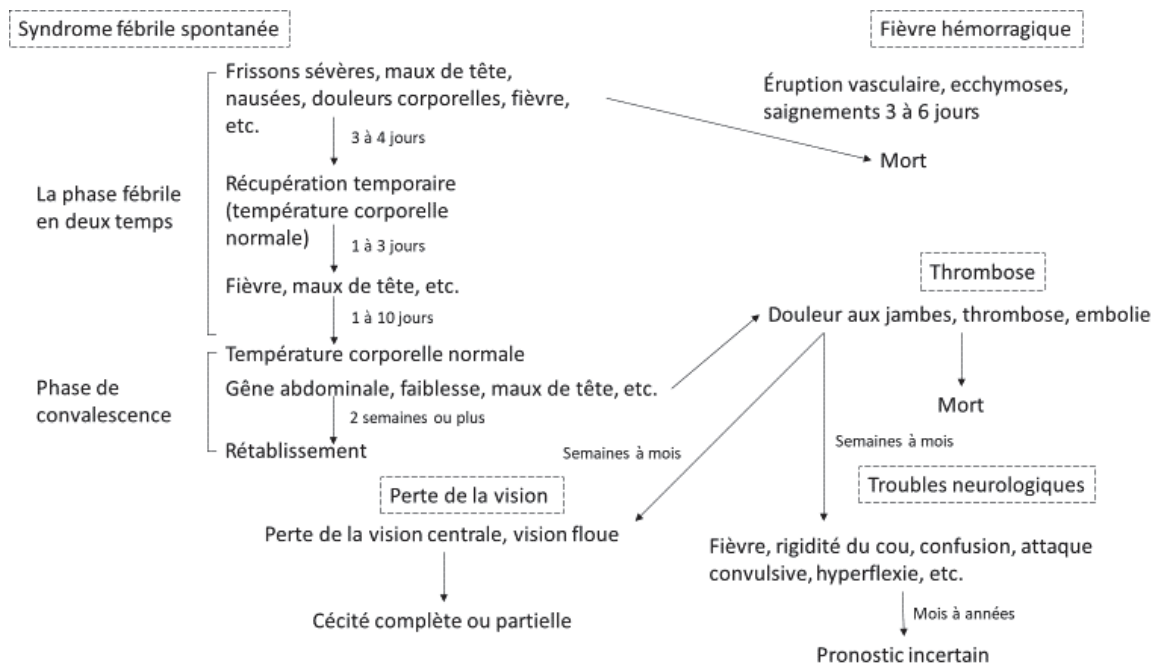


Figure 15 : Pathologie de la FVR chez les humains. Adapté de Ikegami et Makino 2011 (Ikegami et Makino 2011).

Le patient peut aussi présenter une tempête cytokinique à l'origine d'éruptions vasculaires, d'ecchymoses et de saignements caractéristiques d'une fièvre hémorragique (Ikegami et Makino 2011). Cette dernière peut apparaître pendant les différentes phases de la maladie (van Velden *et al.* 1977). L'apparition de formes symptomatiques sévères nécessitent une prise en charge adaptée par les services médicaux. Quant aux formes neurologiques et oculaires, celles-ci nécessitent un suivi constant des patients.

Bien que peu documentée et étudiée, la transmission mère/enfant a été démontré (Adam et Karsany 2008) et il n'est pas à exclure que l'infection par RVFV puisse entraîner des avortements ou une transmission aux nouveaux nés par le lait durant les périodes épidémiques (Arishi *et al.* 2006). Plusieurs cas suspects ont été rapportés par McMillen *et al* dans leur revue mettant ainsi en avant un risque potentiel pour les femmes enceintes durant les périodes épidémiques (McMillen et Hartman 2017).

Afin d'étudier et de mieux comprendre la pathologie induite par le RVFV, différents modèles animaux : i) primates non humains, ii) hamsters, iii) rats et iv) souris ont été développés au fil des années (Ross *et al.* 2012; Anderson *et al.* 1987).

### 1.1.2 Les modèles expérimentaux : les modèles murins et le modèle souris

Les modèles murins regroupent les hamsters, les rats et les souris. Ces différentes espèces ne présentent pas tous les mêmes symptômes de l'infection par le RVFV. En effet, le modèle hamster est susceptible d'induire des fièvres hémorragiques contrairement aux souris. Cette particularité est intéressante dans l'étude de l'apparition de la forme hémorragique ou pour tester un effet souche sur ces formes (Bell *et al.* 2016). Chez les rats femelles gestantes, le taux de mortalité est nettement supérieur à celui observé chez les femelles non gestantes. Cette particularité est intéressante dans l'étude de la transmission mère/enfant, et le passage de la barrière placentaire (McMillen *et al.* 2018).

Les différentes lignées de souris (CD1, BALB/c, IFNAR, Black 6) infectées par le RVFV développent des symptômes similaires à ceux observés chez les jeunes ovins, en fonction de leurs fonds génétiques. Généralement, on distingue une phase précoce caractérisée par des atteintes hépatiques, souvent fatale, puis une phase tardive qui présente des symptômes neurologiques de type méningoencéphalite entraînant la mort de l'animal (Smith *et al.* 2010).

Smith *et al.* ont caractérisé l'infection des souris BALB/c par  $10^3$  PFU de la souche virulente ZH501 inoculée par voie sous-cutanée. Ils ont notamment effectué un suivi longitudinal de la virémie dans les différents tissus et organes. A partir du second jour d'infection, le virus est détectable dans le sérum ainsi que dans le foie, les poumons et les reins. Ces organes ont tous un rôle de filtration des fluides de l'organisme, à l'exception des poumons, ce qui les expose de façon particulièrement importante aux particules virales circulantes. La détection croissante au cours du temps de particules virales infectieuses dans le foie montre une répllication du virus. Des lésions au niveau du foie de ces souris infectées ont pu être observées avec la formation de corps apoptotiques se matérialisant par la formation de poche nécrotique ainsi que des saignements et une hypertrophie de l'organe (Smith *et al.* 2010). L'infection du cerveau est plus tardive et survient plutôt vers le 3ème et 4ème jour avec un pic de virémie au 6ème jour (Figure 16). L'infection du système nerveux central est à l'origine de méningoencéphalite visible par la paralysie des pattes arrière de l'animal (Ross *et al.* 2012). Les autres organes de la souris tels que le cœur, les poumons, les reins et la glande surrénale présentent une virémie croissante du 3ème jour au 6ème jour. L'infection virale entraîne la mort de la moitié des souris

infectées au 3ème jour, la seconde moitié des souris mourant entre le 4ème et le 9ème jour. Le taux de mortalité dans ces conditions expérimentales est de 100%. Il est intéressant de noter que le virus a aussi pu être détecté dans le tissu ovarien dès le 3ème jour (Smith *et al.* 2010).

Plusieurs études ont aussi montré l'importance de la voie d'inoculation du virus dans la pathogénie induite chez la souris. En effet, l'inoculation de fortes doses du virus par voie sous cutanée (SC) ou intrapéritonéale (IP) entraîne généralement des formes hépatiques mortelle.

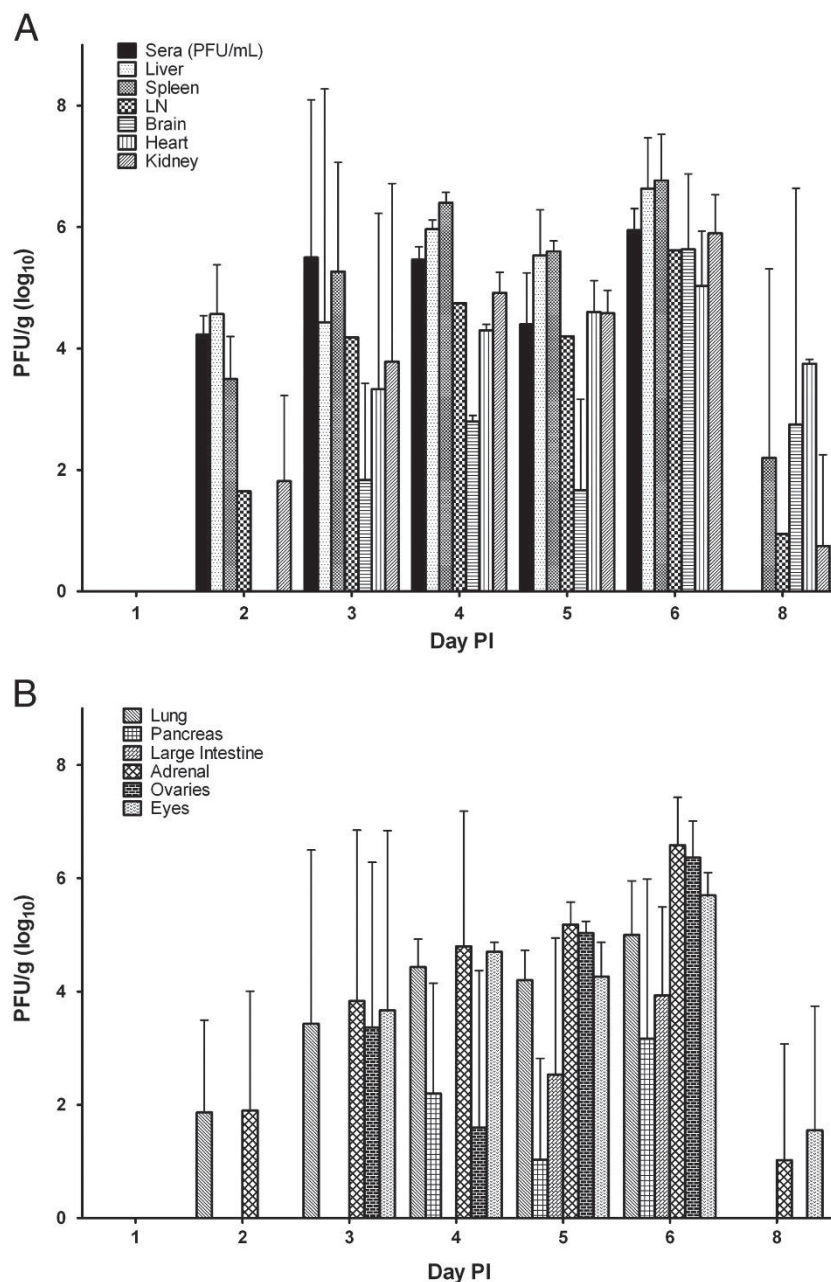


Figure 16 : Mesure du titre infectieux par organe chez des souris infectées par la souche ZH501 (Smith *et al.* 2010). Les souris ont été infectées par voie sous-cutanée à une dose de  $10^3$  PFU, et

sacrifiées chaque jour durant 8 jours. Les organes de chaque souris ont été collectés et le titre infectieux présent dans les organes déterminés en PFU en le rapportant au poids de l'organe.

Dans le but de mieux comprendre l'impact de la route d'inoculation sur la pathogénicité induite par le RVFV, Tomori et Kasali 1979 (Tomori et Kasali 1979) ont testé deux voies d'inoculation, (i) soit par voie IP, (ii) soit par voie intracrânienne (IC) avec différentes souches (Ar55171, Smithburn et Lunyo). L'observation histologique montre une différence des symptômes induits en fonction de la voie d'inoculation. En effet, la voie IC génère dès le 2<sup>ème</sup> jour des lésions cérébrales. Cette voie d'inoculation ne correspond cependant à aucune voie d'infection connue par RVFV. Toujours dans le même objectif, Reed *et al* ont testé l'infection par voie sous SC ou aérosolisation (AERO) chez des souris BALB/c avec la souche ZH501 à une dose de 1600 PFU. Les souris infectées par voie AERO présentent un taux de survie similaire à celles infectées par voie SC avec une médiane de survie de 5 jours, le taux de mortalité dans ces conditions expérimentales est de 100%. La virémie mesurée dans le sérum, le foie et les poumons des souris infectées est comparable entre les deux voies d'inoculation. En revanche, la charge virale mesurée dans le cerveau à partir du 7<sup>ème</sup> jour est plus élevée quand les animaux ont été infectés par voie AERO, celle-ci peut atteindre un titre de 7 à 8 log<sub>10</sub> (PFU/g) contre 4 à 5 Log<sub>10</sub> (PFU/g) pour la voie SC. Cela s'accompagne d'une atteinte du bulbe olfactif chez les souris infectées par voie AERO. En effet, la détection des antigènes viraux peut se faire à partir du 2<sup>ème</sup> jour tandis qu'ils ne pourront être détectés qu'après 7 jours pour les souris infectées par voie SC (Reed *et al.* 2013a). L'ensemble de ces études semble donc indiquer que la voie d'inoculation choisie dans un modèle *in vivo* d'infection par le RVFV peut influencer la pathogénicité induite ou alors favoriser l'infection du système nerveux central (SNC) lorsqu'il s'agit d'une infection par voie AERO.

Différentes lignées de souris ayant des fonds génétiques spécifiques ont été utilisées au cours du temps pour caractériser l'infection par le RVFV, les souris BALB/c et CD1 étant souvent les plus utilisées. Les souris CD1 sont qualifiées de lignées sauvages, car elles ne présentent pas de particularités en termes d'immunité, contrairement aux souris BALB/c qui ont une capacité accrue à répondre à l'immunisation. Ces dernières sont particulièrement intéressantes dans l'étude de la réponse



immunitaire à une infection virale ou bien pour se placer dans un contexte de réponse immunitaire efficace aux infections pour étudier la virulence.

Ikegami *et al* ont utilisé des souris CD1 afin d'explorer les effets de la diversité génétique de RVFV sur la pathogénie (Ikegami *et al.* 2017a). Les auteurs ont inoculé différentes souches de RVFV représentatives des différentes lignées génétiques définies par Bird *et al* et obtenu une différence de pathogénicité entre les souches. La souche de la lignée E (représentée par la souche Entebbe) présente la plus forte virulence entraînant la mort 90% des souris au bout de 2/3 jours après l'inoculation de  $10^3$  PFU en voie intrapéritonéale (IP). La lignée A (représentée par la souche ZH501) entraîne la mort de 90% des souris aux alentours de 7 jours post infection (Figure 17A). Dans cette même étude, les auteurs ont identifié deux clones de la souche Zinga qui présentaient 3 mutations situées dans la nucléoprotéine (N), la protéine non-structurale (NSs) et la polymérase (L) (Ikegami *et al.* 2017a). Le virus rZinga Cl1 portant la mutation N E216G alors que le virus rZinga Cl3 présente les mutations NSs L218R et L E316G. De façon intéressante, le clone 1 induit la mort de la totalité des souris CD1 inoculées alors que le clone 3 est totalement atténué (Figure 17B). Une population virale a aussi détecté dans un stock de la souche ZH501 avec la substitution d'un nucléotide à la position 847 du segment M (correspondant à la séquence codant la protéine Gn). Les auteurs ont ensuite pu montrer que le virus ZH501 wt et rZH501-M847-A étaient plus virulent que le virus rZH501-M847-G chez les souris CD1 (Morrill *et al.* 2010a).

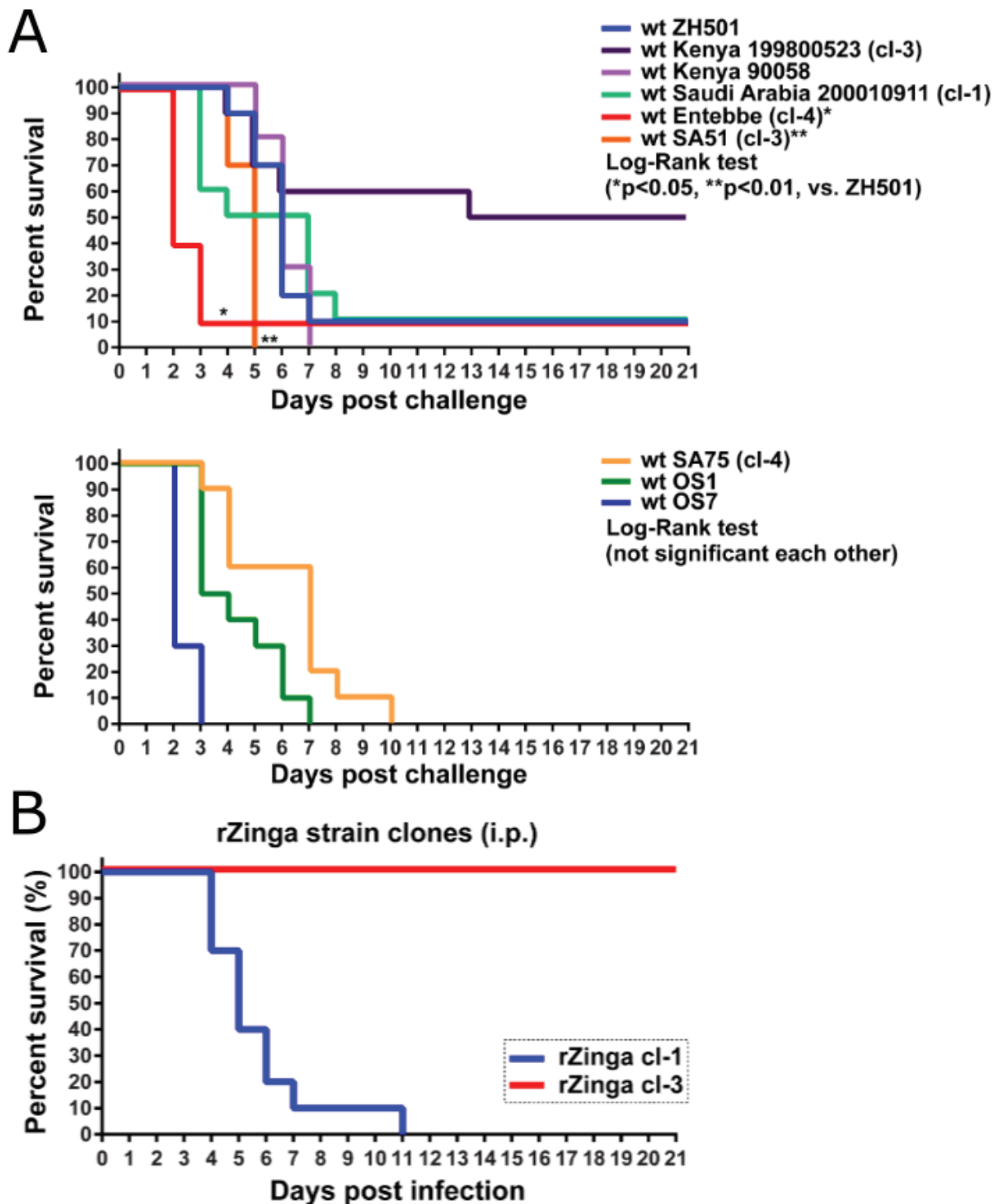


Figure 17: Etude de la virulence de plusieurs souches de RVFV chez la souris CD-1 (Ikegami et al. 2017a). (A) Courbe de survie des souris CD1 infectées par voie intrapéritonéale (IP) avec les souches ZH501 (lignée A), Kenya 199800523 (lignée B), Kenya 90058, Saudi Arabia 200010911 (lignée C), Entebbe (lignée D), SA75 (lignée E), OS1 et OS7 (lignée F) ou SA51 (lignée G) à une dose de  $10^3$  PFU. (B) Courbes de survie de souris infectées par les virus rZinga Cl1 ou Cl3 avec une dose de  $10^3$  PFU par voie intrapéritonéale.

Des modèles de petits ruminants et de primates non humains ont également été développés en particulier pour étudier l'immunité protectrice induite par les candidats vaccins anti-FVR, ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

## 1.2 Mesures de lutte et de contrôle de la FVR

La FVR entraîne de lourdes pertes économiques directes et indirectes avec un impact important sur le cheptel qui est source de revenus et d'alimentation pour les éleveurs. Une épidémie de FVR entraîne généralement une diminution voire un arrêt des échanges commerciaux à l'intérieur d'un pays ou entre pays. Les services de santé sont aussi potentiellement très impactés avec un coût important pour les pays concernés. Afin d'assurer la lutte contre l'émergence et de limiter la diffusion de la FVR, différentes stratégies ont été implémentées par les autorités sanitaires des pays touchés et doivent aboutir à une approche intégrée.

### 1.2.1 Mise en place de troupeaux sentinelles basée sur des cartes de risque d'occurrence de la FVR

Le diagnostic de la FVR se fait selon 2 méthodes :

(i) Par biologie moléculaire pendant la phase virémique de l'infection (J0 à J6/J8) (Figure 18). La détection de l'ARN viral se fera par RT-PCR et témoigne d'une circulation active du RVFV dans le troupeau (Wichgers Schreur *et al.* 2021).

(ii) Par sérologie en mesurant le niveau d'anticorps produits, avec les anticorps de types IgM et IgG (Figure 18). Les anticorps de type IgM peuvent être détectés à partir du 7-9ème jours après l'exposition au virus, cela indique une exposition récente au pathogène (moins de trois mois) et donc une circulation probable de celui-ci. Les anticorps de type IgG sont détectables dès J10 post-infection et sont présents pendant toute la durée de vie économique de l'animal. Leur détection chez un animal signifie une exposition passée au virus mais elle ne permet pas de dater précisément le moment de l'exposition, sauf si elle est faite chez des jeunes animaux dont la date de naissance est connue (Wichgers Schreur *et al.* 2021).

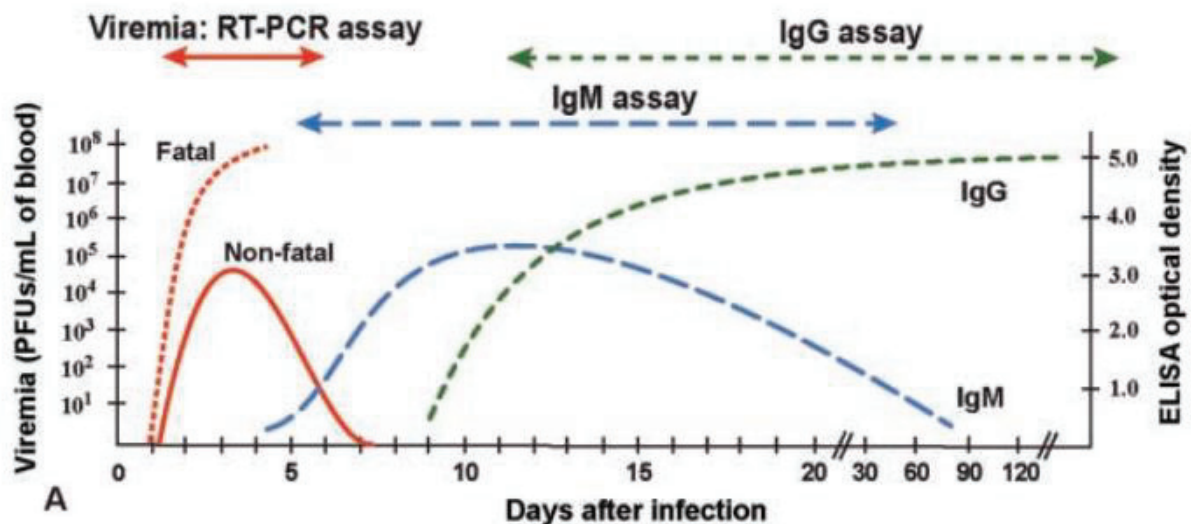


Figure 18: Evolution des paramètres biologiques permettant le diagnostic de la FVR (Bird *et al.* 2009).

La détection précoce de l'introduction et/ou de la circulation active du RVFV via une surveillance sanitaire des troupeaux (active et passive) est critique dans la gestion des épidémies. La surveillance active de la FVR peut se faire via la mise en place de troupeaux dit sentinelles (Kasiiti *et al.* 2014), choisis dans les régions à haut risque de circulation du virus, c'est-à-dire des zones où les différents facteurs favorisant l'occurrence de FVR (événements pluvieux, présence d'un/des points d'eau favorable(s) à la présence et/ou à la pullulation de moustiques, présence de marchés de bestiaux sources d'échanges commerciaux) sont réunis (Soti *et al.* 2013). Les cartes de risque doivent être régulièrement mises à jour pour servir de base pour le choix et le positionnement des troupeaux sentinelles (Tran *et al.* 2016). La circulation active du RVFV est recherchée dans ces troupeaux pour alerter de la survenue d'une nouvelle épizootie, par la détection d'anticorps de type IgM ou de type IgG sur des jeunes animaux de moins de 1 an.

L'approche de troupeaux sentinelles a été mise en place par les services vétérinaires et est fonctionnelle dans plusieurs pays dont le Sénégal, la Mauritanie et l'Arabie Saoudite. Dans la région de Jizan, en Arabie Saoudite, en 2003, elle a permis de mettre en évidence la circulation du virus entre le mois d'août 2004 et de janvier 2005 dans les régions à risque (Elfadil *et al.* 2006). La mise en place de ces animaux sentinelles s'est donc avérée efficace et devrait permettre l'implémentation, de façon ciblée, des autres stratégies à notre disposition, telle que la lutte antivectorielle et la vaccination.

### 1.2.2 La lutte anti vectorielle (LAV)

La lutte antivectorielle comprend un objectif de réduction des populations de moustiques par le biais de différentes mesures telles que la protection individuelle (par des moustiquaires, le port de vêtements adaptés, l'utilisation de répulsifs), l'information collective de désinsectisation (par des campagnes de sensibilisation/communication vers le grand public, élimination des eaux stagnantes), l'application d'insecticides dans les zones touchées. Une LAV efficace passe par une surveillance entomologique permettant de connaître la diversité des espèces vectrices présentes dans une région ou un pays donné. La collecte de moustiques se fait par le biais de différents types de pièges possédant des systèmes attractants (pièges à appâts animaux ou humains, piège BG sentinelles, piège CDC-light-trap avec CO<sub>2</sub>) (Sriwichai *et al.* 2015; Degener *et al.* 2021).

Plusieurs approches de LAV peuvent ainsi être envisagées en fonction de la nature des espèces présentes. Le stade larvaire et le stade adulte du moustique sont les cibles majeures des insecticides.

#### - Lutte au niveau du stade adulte

Un traitement par insecticides, (i) par épandage/dispersion (à pied, en véhicules 2 roues, voie aérienne) de larges zones ou (ii) par pulvérisation de zones plus restreintes est possible (Alhaj Mutaz 2019). Cette méthode cible les environnements riches en végétation qui peuvent abriter les moustiques ou les zones écologiques dans lesquelles s'abritent les animaux. L'utilisation d'insecticides non réémanant est à privilégier, leurs efficacités en zones boisées est limitée et leur utilisation en zones urbaines interdite.

Ces deux types de traitements emploient des molécules non sélectives dites généralistes, telles que les pyréthriinoïdes qui impactent sévèrement la biodiversité. De plus, l'emploi massif de ces molécules chimiques induit la sélection d'individus résistants rendant l'éradication par voie chimique de plus en plus contraignante et de moins en moins efficace.

D'autres approches innovantes de lutte dites biologiques sont développées, telles que la TIS (Technique de l'Insecte Stérile), appelée aussi « lutte autocide », qui a pour but d'irradier les moustiques mâles par des rayonnements ionisants puis de les

relâcher en grand nombre dans une région donnée. L'insémination naturelle des femelles sauvages par les mâles stériles relâchés donne lieu à la ponte d'œufs non-viables. Au fur et à mesure des générations, le nombre de progéniture viable diminue jusqu'à une élimination ou une réduction locale de la population de l'espèce de moustique ciblée. Cette approche a déjà été initiée sur plusieurs espèces de moustiques dont certaines connues pour transmettre le RVFV (i.e. *Ae aegypti*).

#### - Lutte au niveau larvaire

La lutte anti-larvaire est souvent mise en œuvre en combinaison avec la lutte anti-adulte. Elle vise à réduire le nombre de gîtes de ponte en supprimant certaines zones buissonnantes ou points d'eau stagnant (Alhaj Mutaz 2019). Une approche de contrôle biologique est aussi employée dans certains pays. Cette stratégie est basée sur l'introduction de prédateur des larves dans les plans d'eau où pondent les moustiques. L'introduction de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (Alhaj Mutaz 2019) joue le rôle de prédateur sur les larves (Anyamba *et al.* 2010). Ce type de stratégie a été développé pour la lutte contre les nuisances mais peut présenter un intérêt dans la lutte contre le paludisme ou les arboviroses dont fait partie la FVR.

Ces approches de lutte antivectorielle permettent de limiter la multiplication des vecteurs dans les zones d'activité du virus mais elles ne garantissent cependant pas une protection complète pour les animaux.

### 1.2.3 Approches vaccinales

Plusieurs approches vaccinales ont été développées.

#### (i) Atténuation de souches virulentes isolées du terrain par passages successifs.

Pour la souche Smithburn, son développement a été réalisé en 1945 par l'atténuation d'une souche isolée à Entebbe (Uganda) (Smithburn 1949). Cette souche nommée Smithburn a été atténuée par passages successifs sur cerveaux de souris. L'inoculation de cette souche atténuée chez le mouton a induit sa séroconversion avec la production d'anticorps neutralisants dirigés contre le RVFV. Toutefois cette souche neuro-adaptée est à l'origine d'effets secondaires chez les moutons souvent matérialisés par l'apparition d'un syndrome fébrile ainsi qu'une virémie circulante importante. Récemment, il a été montré qu'une infection par cette souche pouvait être fatale chez l'alpaga, avec l'apparition d'un syndrome neurologique de type

encéphalite ainsi que des signes de congestion pulmonaire et de saignements (Anthony *et al.* 2021). La présence d'une charge virale importante circulante durant la phase symptomatique présente aussi un risque important de transmission par contact ou aérosol pour les éleveurs et les vétérinaires (Tomori 1979; Anthony *et al.* 2021; Faburay *et al.* 2017). La question de la transmission possible de cette souche par les moustiques autour des élevages vaccinés se pose encore et aurait pour conséquence une circulation non-contrôlée de cette souche dans l'environnement avec la possibilité de réassortiments avec une souche sauvage. La souche Smithburn a été souvent employée en Afrique de l'Est et du Sud pour la vaccination des troupeaux ou durant les épizooties (OIE), mais l'est beaucoup moins de nos jours.

La souche MP-12 a été obtenue en passant successivement de la souche ZH548 sur des cellules FRL (Foetal Rhesus Monkey Lung) en présence de mutagène 5-fluorouracil (Caplen *et al.* 1985). L'atténuation et le potentiel vaccinal de cette souche furent testés en modèle murin. Les souris ont été infectées par voie SC avec une dose de  $10^7$  PFU de différents passages. A partir du 7<sup>ème</sup> passage, le virus n'induisait la mort que de moins de 50% des souris infectées. Le virus issu du 12<sup>ème</sup> passage n'induisait pas, quant à lui, de mortalité et fut donc sélectionné et nommé MP-12 (Caplen *et al.* 1985). Il présente 23 mutations distribuées sur les trois segments génomiques du virus (Saluzzo et Smith 1990; Ikegami *et al.* 2015). Plus récemment, Ikegami *et al.* ont exploré plus en profondeur les différentes positions responsables de l'atténuation de la virulence de la souche MP12 par rapport à la souche parentale ZH548 (Ikegami *et al.* 2015). Les auteurs ont pu mettre en avant que les mutations Y259H (Gn), R1182G (Gc), et R1029K (L) étaient suffisantes pour permettre l'atténuation de la souche rZH548. Cette souche a aussi été testée pour la vaccination humaine par l'Armée Américaine (Pittman *et al.* 2016). En effet, lors de la phase 1 d'essais clinique, 22 volontaires ont reçu des dilutions sérielles d'un facteur 10 à partir d'une dose initiale de  $10^{4.4}$  PFU. Seule la dose non diluée a induit des effets secondaires de faible à modéré. Parmi les effets rapportés les plus fréquents consistaient à des maux de tête, des nausées et des malaises. Seules trois personnes ont présenté des effets secondaires montrant une faiblesse musculaire et une chute de lymphocytes. La virémie circulante maximale fut de  $1.3 \log_{10}$  (PFU/mL) au 9<sup>ème</sup> jour post vaccination. Parmi les volontaires, 80% ont montré une présence d'IgM anti-RVfV et 50% d'entre eux ont produits des IgG neutralisants. La phase

clinique 2 incluait 19 participants volontaires âgés de 18 à 50 ans qui ont reçu une dose de  $10^5$  PFU par voie SC. Pittmann *et al* ont suivi l'apparition d'effets secondaires, la séroconversion et la durée de la protection immunitaire sur une période de 12 mois post-inoculation (Pittman *et al.* 2016). Seulement 4% des volontaires ont présenté des effets secondaires limité à un syndrome grippal avec maux de tête et fièvre ( $38.3^{\circ}\text{C}$ ), 9 jours après l'infection. Aucune séquelle d'ordre visuel ou cardiovasculaire n'a été détecté. Au 28ème jour, 95% des volontaires ont présenté une séroconversion IgG induisant 80% de neutralisation. Alors que les 5% des volontaires restants, ont, quant à eux, produit des IgG neutralisant moins efficace. Les auteurs se sont aussi intéressés à la stabilité du génome de la souche MP-12 en isolant le virus à partir du sérum de 5 volontaires au 14ème jour. Un total de 8 mutations distribuées sur les 3 segments a été observé. Aucune d'entre elles ne correspondait à des mutations de réversion correspondant à la souche ZH548 d'origine (Pittman *et al.* 2016).

En 1974, la souche appelée Clone 13 a été isolée d'un patient originaire de République Centre Africaine (RCA). Son séquençage a permis de montrer qu'elle possède une délétion de 549 nucléotides dans le segment S qui conduit à l'expression d'une forme tronquée de 70% de la séquence de la protéine NSs, un facteur de virulence décrit de RVFV (voir paragraphe 1.6.1). Il a ensuite été montré que cette souche était atténuée tout en restant répliquative *in vitro* (Muller *et al.* 1995a). Cette souche a reçu une autorisation de mise sur le marché et est commercialisée par 2 laboratoires sous licence exclusive, Onderstepoort Biological Products (OBP, Onderstepoort, Afrique du Sud), et MSD. De nombreuses études ont prouvé l'efficacité protectrice de cette souche au Sénégal (Lo *et al.* 2015). Une étude a pu mettre en évidence la capacité de cette souche à traverser la barrière placentaire. Des fœtus présentaient des malformations du système nerveux central, des muscles squelettiques, ainsi que des œdèmes et des traces de nécroses. Ainsi, 30% des femelles infectées ont avorté après 76 jours d'infection (Makoschey *et al.* 2016). Des travaux de thermostabilité de ce clone 13 initial ont abouti au clone 13T (clone 13 thermostable), commercialisé par 2 laboratoires pharmaceutiques au Maroc, le laboratoire MCI et le laboratoire Biopharma à Rabat. Ce clone 13T a également été testé sur différentes espèces et prouvé son efficacité en terme d'induction de réponse immunitaire (Daouam *et al.* 2014; 2015; 2016)



Plus récemment, il a été montré que le clone 13 était capable de se répliquer chez deux espèces de moustiques : *Ae vexans* et *Cx p quinquefasciatus*, ce qui pose, là encore, la problématique d'une possible transmission (bien que la probabilité soit qualifiée de faible par les auteurs) ou des possibilités de réassortiment génétique sur le terrain (Moutailler *et al.* 2010).

(ii) Vaccins inactivés.

Pittmann *et al* ont testé l'efficacité protectrice conférée d'un vaccin inactivé à la formaline et lysé (TSI-GSD-200) chez 598 personnes sur une période de 12 ans (Pittman *et al.* 1999). Le vaccin inactivé, avec une dose de rappel, a induit une séroconversion avec la production d'IgG neutralisants chez tous les volontaires. Toutefois la capacité de neutralisation de ces anticorps ne dure, en moyenne, que 200 jours. Les auteurs ont employé un protocole de vaccination incluant jusqu'à 4 rappels, sans pour autant augmenter la durée de la protection conférée par le vaccin. La nécessité de rappels périodiques est donc un frein à l'utilisation à grande échelle de ce type de vaccins.

(iii) Vaccins vectorisés

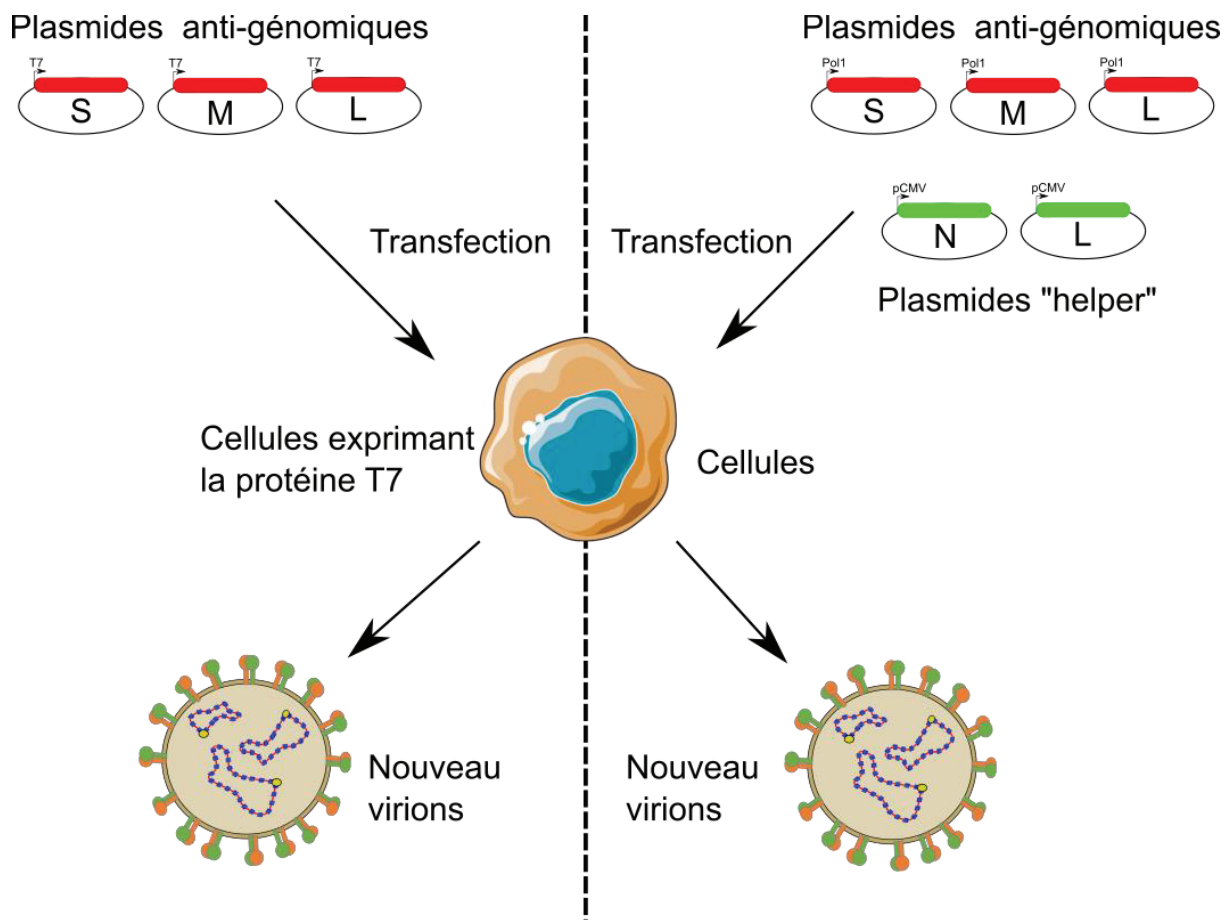
Différentes approches faisant appel à la recombinaison homologue ont été utilisées pour produire des vaccins recombinants à partir des vecteur viraux du type vaccinia virus MVA (Modified Vaccinia Ankara) (Busquets *et al.* 2014; Papin *et al.* 2011; López-Gil *et al.* 2013), poxvirus (Wallace *et al.* 2006; Ayari-Fakhfakh *et al.* 2012), adénovirus (Warimwe *et al.* 2016) et virus de Newcastle (Kortekaas *et al.* 2010). Ces approches utilisent majoritairement les glycoprotéines d'enveloppe Gn et Gc. Ces vaccins recombinants peuvent être employés pour la vaccination animale (Faburay *et al.* 2017). L'avantage de cette approche est la production de vaccins multivalents permettant une protection dirigée contre plusieurs pathogènes à la fois. Un exemple de ce type de vaccin est le virus MVA-GnGc-VP2 qui utilise le vecteur viral de la vaccine (MVA, Modified Vaccinia Ankara) exprimant les protéines VP2 et NS1 du virus de la bluetongue (BTV) et les glycoprotéines Gn/Gc de RVFV. Ce virus permet une protection efficace contre les deux virus BTV et RVFV chez les souris BALB/c puisqu'aucune mortalité n'a été observée après les challenges infectieux de BTV ou de RVFV (souche ZH501) (Calvo-Pinilla *et al.* 2020).

Les souches vaccinales employées pour la protection des troupeaux ne sont donc pas sans risque et aucun vaccin vivant atténué n'a été autorisé pour la vaccination humaine. Leur mise en place sur le terrain représente aussi un coût important pour les états et les éleveurs. Il est donc important de pouvoir développer de nouvelles stratégies vaccinales efficaces et offrant une protection de longue durée.

#### 1.2.4 Le système de génétique inverse de RVFV et ses applications vaccinales

La technologie de la génétique inverse est un outil moléculaire puissant pour étudier les virus, mais elle a aussi été utilisée pour le développement d'approches vaccinales pour lutter contre la FVR (Kalveram *et al.* 2011). Chez les Bunyavirus, les systèmes de génétique inverse développés sont souvent basés sur l'utilisation de la polymérase T7, mais d'autres systèmes sont basés sur l'utilisation des ARN polymérases I cellulaires (Bridgen et Elliott 1996; Bouloy et Flick 2009) (Figure 19). Ces derniers présentent le désavantage de devoir utiliser des systèmes « helper » permettant d'augmenter l'expression des protéines virales N et L (Flick *et al.* 2003; Billecocq *et al.* 2008). De plus, la protéine NSs inhibe de façon globale la transcription cellulaire (voir paragraphe 1.6.4).

Le système de génétique inverse basé sur le promoteur T7, que j'ai utilisé durant mes travaux de thèse, n'a pas un besoin de système « helper », mais nécessite néanmoins que les cellules expriment la polymérase T7. Ceci peut être réalisé par l'utilisation de cellules modifiées génétiquement telle que la lignée BSR-T7 ou bien par transfection d'un plasmide d'expression de la polymérase T7.



**Figure 19 : Schéma présentant des approches de génétique inverse développées pour le RVFV.** La partie gauche du schéma représente l'approche de transfection de plasmides codant pour les 3 segments anti-génomiques du RVFV sous le contrôle d'un promoteur T7 (Bridgen et Elliott 1996). La partie de droite du schéma représente le système de génétique inverse basé sur la transfection de plasmides codant pour les 3 segments anti-génomiques du RVFV placés sous le contrôle d'un promoteur ARN pol I et de plasmides d'expression des protéines N et L sous contrôle d'un promoteur reconnue par la cellule hôte (exemple : pCMV) (Bouloy et al. 2009).

Une première approche de génétique inverse pour atténuer RVFV a été de modifier son génome viral pour abolir l'expression des protéines non structurales. Ainsi, Bird et ses collaborateurs ont généré, à partir de la souche ZH501, des virus pour lesquels les séquences codantes pour la NSs (Seg-S) et/ou NSm (Seg-M) ont été délétées. L'inoculation à de rats par voie sous-cutanée d'une dose de  $10^3$  PFU des différents virus, suivie d'un challenge infectieux avec la souche ZH501 montre une meilleure protection de la part du virus recombinant n'exprimant ni NSs ni NSm, liée à une plus forte production d'anticorps neutralisants (Bird et al. 2008).

Wichgers Schreur et al ont généré un virus dont le génome a été modifié de façon à avoir un segment supplémentaire portant les régions 5' et 3' non traduites du segment M encadrant la séquence codante de la protéine Gc alors que le segment M

d'origine ne contenait plus que les séquences codantes des protéines NSm/Gn (Wichgers Schreur *et al.* 2014). Sa capacité de répliation *in vitro* en cellules de mammifères est similaire au virus ZH501. Il a été ensuite évalué *in vivo* chez des souris BALB/c infectées par voie IP. Un taux de survie de 100% des souris, avec séroconversion, a été observé. Plus récemment, ce virus à 4 segments a été testé chez des agneaux (8-10 semaines), des chevreaux (9 semaines) et des veaux (2 à 3 semaines) (Wichgers Schreur *et al.* 2020). Vingt et un jours après vaccination, ces animaux ont été éprouvés avec le souche virulente ZH501. Les auteurs ont observé la survie des animaux vaccinés mais aussi leurs séroconversions montrant ainsi l'efficacité vaccinale de cette approche, qui présente aussi l'avantage de ne pas induire de virémie et de ne pas disséminer chez les animaux

### 1.3 Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift

#### 1.3.1 Le génome viral

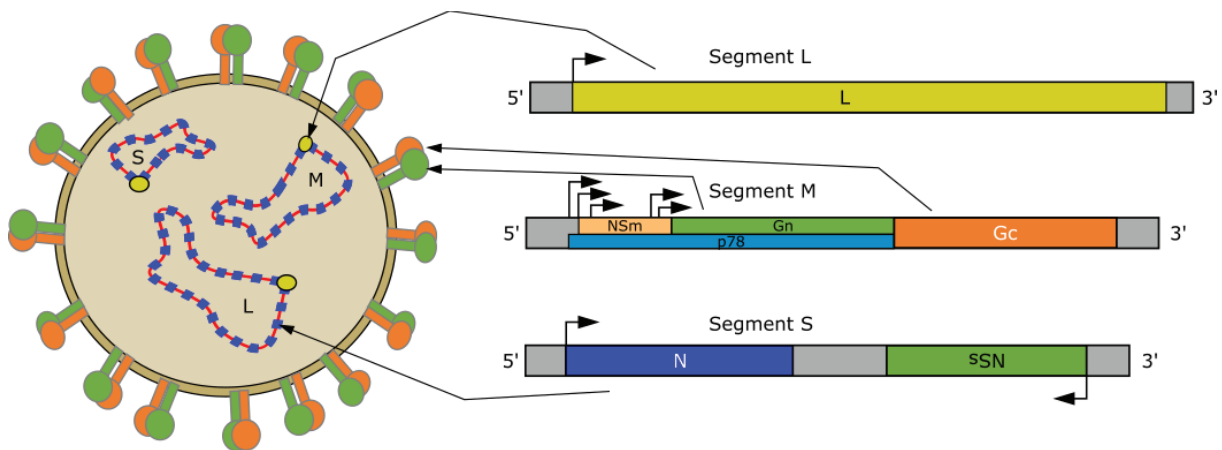
##### 1.3.1.1 Les cadres de lectures du génome

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift est un virus à ARN simple brin de polarité négative. Son génome est segmenté avec 3 segments de tailles différentes nommés Small (S) de 1691 nt, Medium (M) de 3884 nt et Large (L) de 6404 nt (Figure 20). Durant le processus d'infection, l'ARN viral est transcrit en ARN de polarité positive qui est pris en charge par la machinerie de traduction cellulaire pour réaliser la synthèse des protéines virales (Figure 20). Toute l'activité de transcription et de traduction est réalisée dans le cytoplasme des cellules hôtes.

Le segment L code pour une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) impliquée, notamment, dans le processus de répliation et de transcription de l'ARN viral. Je détaillerai la fonction de chaque protéine plus loin dans ce manuscrit.

Le segment M possède 5 codons d'initiation identifiés (nommés AUG1 à AUG5) et qui se trouvent tous dans le même cadre de lecture (ORF, Open Reading Frame). Ils permettent donc l'expression de polyprotéines de taille différente. Elles sont maturées par des protéases cellulaires telles que la signal peptidase en 5 protéines : la protéine p78, les protéines non structurales NSm et NSm', et les deux glycoprotéines d'enveloppe Gn et Gc.

Le segment S est, quant à lui, de nature ambisens, c'est-à-dire que chaque orientation de ce segment possède un ORF. Le premier ORF est porté par le brin anti-génomique et permet la synthèse de la nucléoprotéine virale (N). Le second ORF est porté par le brin génomique et permet la synthèse d'une autre protéine non-structurale appelée NSs. Le caractère ambisens du segment S a un impact sur la temporalité de l'expression des protéines virales où la protéine N sera exprimée plus précocement que la protéine NSs (Struthers *et al.* 1984; Brennan *et al.* 2014). Cette différence de temporalité d'expression est due à la position de l'ORF de la protéine N en effet celui-ci sera transcrit directement à partir de l'ARN génomique contrairement à la protéine NSs qui ne pourra être transcrit qu'à partir de l'antigénome (Gaudreault *et al.* 2019).



**Figure 20 : Représentation schématique de la particule virale et de la structure du génome de RVFV.** La particule virale de RVFV est composée d'une enveloppe lipidique où les glycoprotéines Gn et Gc sont enchâssées. A l'intérieur de la particule virale se trouvent les 3 segments sous leur forme ARN simple brin négatif protégés par la protéine N et en interaction avec la protéine L. Les trois segments portent les différentes régions codantes pour les protéines structurales L, Gn, Gc, N et p78 ainsi que les protéines non structurales NSm, NSm' et NSs.

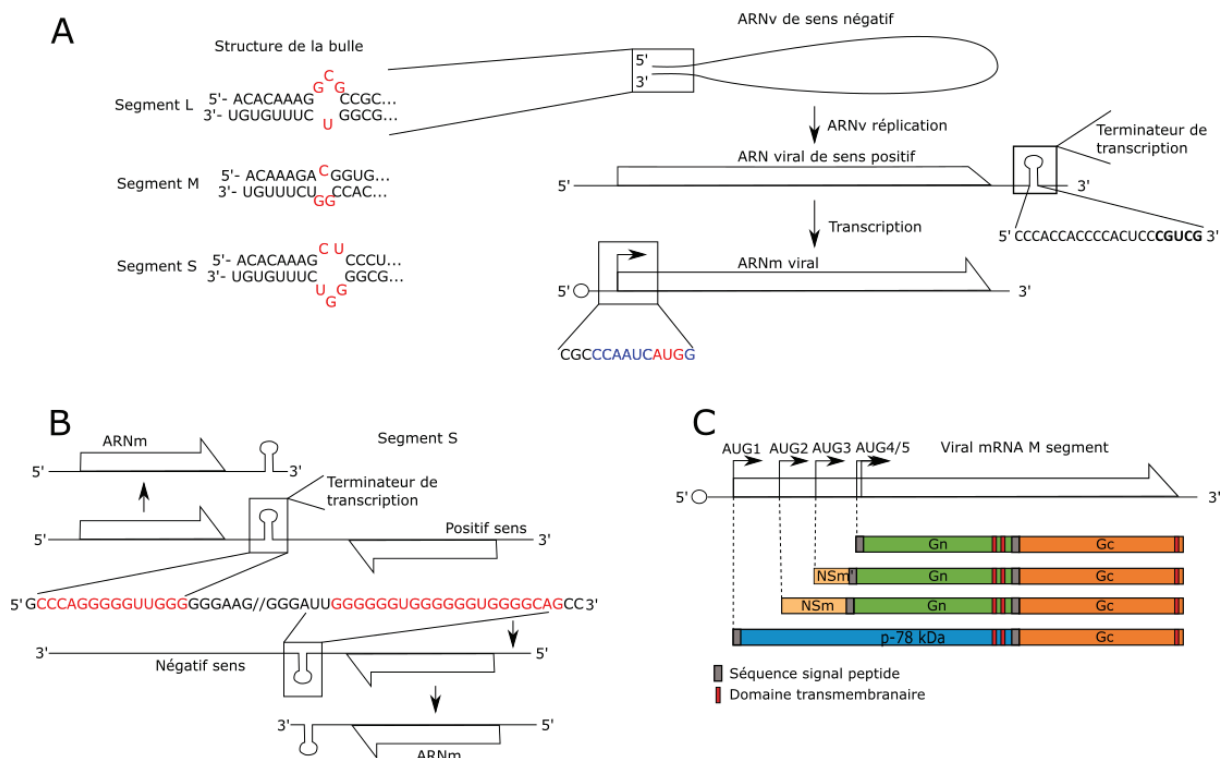
### 1.3.1.2 Les séquences régulatrices de l'expression du génome

Les trois segments génomiques ont leurs cadres de lecture ouverts (ORF) encadrés par les régions 5' et 3' non traduites (UTR, untranslated region). Ces régions jouent un rôle particulièrement important dans la régulation du métabolisme de l'ARN viral. Tout d'abord, la complémentarité des régions 5' et 3' UTR permet la formation d'une structure secondaire double brin de l'ARN d'une longueur d'environ 15 nucléotides (nt) dite « panhandle ». La structure panhandle est ainsi constituée d'une structure tige possédant une « boucle » interne de plusieurs nucléotides (Figure 21A). Cette structure est impliquée dans le processus de réplication et de transcription chez les

*Phenuiviridae*. En particulier, elle permet le recrutement de la protéine L, l'ARN polymérase ARN dépendante, sur l'ARN viral. Pour cela, la protéine L interagit avec la structure panhandle grâce à son domaine protéique appelé « fingertips » situé dans le domaine catalytique de la protéine (Chen *et al.* 2021).

La « boucle » interne de la structure panhandle est impliquée dans l'initiation de la transcription. En effet, il a été montré pour un virus appartenant au même genre que RVFV, le virus Uukuniemi (UUKV), que plus l'énergie libre des interactions de nucléotides est négative, plus l'activité transcriptionnelle est efficace (Flick *et al.* 2002; Ikegami *et al.* 2007). Flick *et al.* se sont intéressés à la composition nucléotidique de la panhandle et à l'ouverture au niveau de la position 10 des segments génomiques de UUKV (Flick *et al.* 2002). Les auteurs ont pu montrer grâce à un système rapporteur de luciférase (rLuc) que plus la taille de la boucle était petite plus la luminescence mesurée était forte. L'activité transcriptionnelle de la protéine L étant probablement à l'origine de ces différences de mesure. Comme tous les Phlébovirus, RVFV possède aussi cette structure panhandle dans les régions 5' et 3' UTR. Toutefois, la forme et la taille de la boucle générée sont différentes entre les segments génomiques. Le segment M présente la boucle la plus petite des 3 segments (Figure 21A).

La terminaison de transcription est, quant à elle, régulée par une structure située dans la région 3'UTR du brin négatif (Figure 21A et B). L'arrêt de la transcription du génome du RVFV est un processus qui est encore mal décrit, mais Ikegami *et al.* ont montré que l'arrêt de transcription pour les ORF du segment M, de N et de NSs est dû à une structure tige-boucle d'environ 16 nt contenant un motif pentamérique 3'CGUCG5' (Figure 21A et B) (Albariñ *et al.* 2007; Ikegami *et al.* 2007). Les auteurs ont pu montrer l'importance du motif 3'CGUCG5' dans la formation de la tige bouche à l'aide d'un système de mini génome codant pour un gène rapporteur luciférase. Le segment L est un peu différent puis qu'aucun motif 3'CGUCG5' n'a pu être identifié. Ils ont toutefois pu mettre en évidence que la séquence nucléotidique, située entre les positions 6324 et 6368, forme une structure tige-boucle qui pourrait agir comme un terminateur de transcription.



**Figure 21 : Représentation schématique des séquences régulatrices de l'expression du génome viral.** (A) Cas du segment L pour illustrer le passage de l'ARN génomique de polarité négative vers un ARN de polarité positive qui peut être traduit. L'étape de transcription est régulée par deux régions. La boucle de régulation de transcription est représentée par l'ouverture dans la structure « panhandle » formée par l'hybridation des régions 5' et 3' UTR. La région 3' UTR comprend la structure tige boucle permettant l'arrêt de la transcription. L'ARNm porte une séquence régulatrice de la traduction sous forme de la séquence de Kozak (bleu) et le codon d'initiation (rouge). (B) Schéma de la structure de la région intergénique du segment S et de la stratégie de régulation ambisens de la transcription des séquences codantes pour la protéine N et NSs du segment S. (C) Schéma de la stratégie de traduction de l'ARN du segment M dépendante des codons d'initiation de traduction utilisés (AUG1 à AUG5). L'AUG 3 permet la traduction d'une protéine alternative de la protéine NSm appelée NSm'. Les séquences des peptides signaux sont illustrées en gris et permettent l'adressage au réticulum endoplasmique pour la traduction des protéines.

L'efficacité de traduction est, quant à elle, régulée par la séquence Kozak entourant les codons initiateurs de traduction AUG. Cette séquence démarre au moins 6 nucléotides en amont du codon d'initiation et se termine 1 nucléotide après celui-ci (Noderer *et al.* 2014). Brièvement, durant le processus d'initiation de la traduction, la petite sous-unité 40S du complexe ribosomique scanne l'ARN. Ensuite, la protéine eIF1 présente au sein de ce complexe permet la discrimination des triplets AUG des non-AUG. Quand la sous-unité 40S associée à l'ARNt-Met scanne un codon d'initiation AUG, elle est temporairement stoppée par un changement de conformation de la protéine eIF2 $\alpha$  due à son interaction avec les purines en position -3 et +4 autour de l'AUG. Cela induit l'hydrolyse de GTP associé au facteur eIF2 $\alpha$  ce qui permet le

recrutement des autres partenaires protéiques du complexe de traduction (grande sous-unité 60S, facteur d'initiation eIF5B, ...) et, in fine, la traduction du cadre de lecture situé en aval (Jackson *et al.* 2010). La séquence Kozak joue donc un rôle clé dans ce processus d'initiation de la traduction de l'ARN viral (Jackson *et al.* 2010).

Le segment M présente une stratégie de traduction différente des autres segments comme évoqué précédemment avec 5 codons d'initiation de la traduction situés dans le même cadre de lecture (Figure 21C). Il est intéressant de noter que les codons d'initiation de traduction AUG2 à AUG5 présentent une séquence Kozak optimisée pour la traduction chez les mammifères : 5'GCCACCAUGGU3' (Noderer *et al.* 2014). Le premier AUG codant pour p78 présente, quant à lui, un contexte de Kozak plus proche de la séquence consensus observée chez les insectes 5'CAAACAUGG3' avec notamment une séquence riche en adénines en amont de l'AUG (Cavener 1987). Il a été montré que la protéine p78 était incorporer à la surface des virions issus de l'infection de cellules C6/36 (Weingartl *et al.* 2014). Terasaki *et al.*, ont quant à eux, montrer qu'il était possible de détecter l'expression de la p78 en cellules de mammifère en adaptant le contexte Kozak (Terasaki *et al.* 2021).

### 1.3.2 Le cycle viral

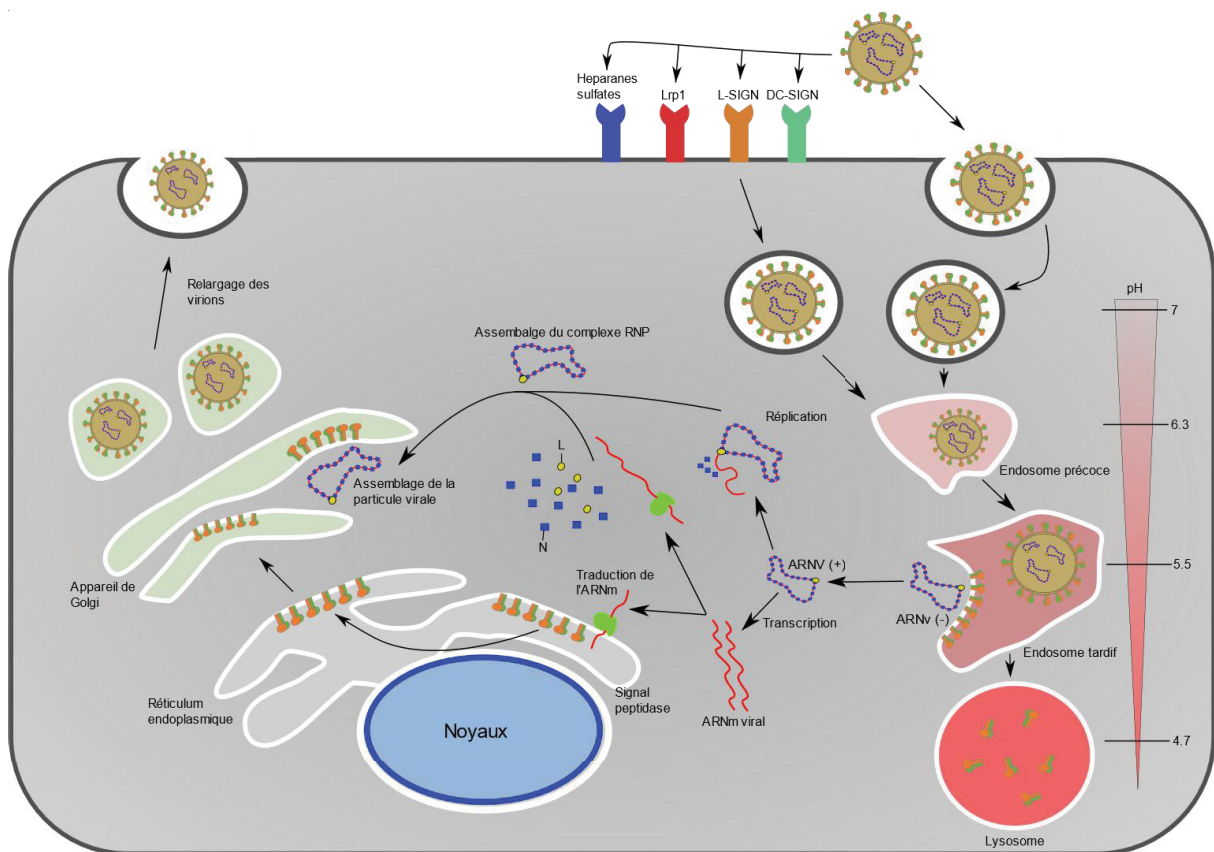
Le cycle viral se décline en différentes étapes importantes pour la production de nouveaux virions à la suite de l'infection d'une cellule par le virus. Il comprend une phase précoce correspondant aux étapes d'attachement, d'entrée et de relargage du génome viral dans le cytoplasme et d'une phase dite tardive comprenant l'expression du génome viral ainsi que sa réplication, l'assemblage et le relargage des virions nouvellement produits (Figure 22).

La première étape est celle de l'attachement suivie de l'entrée du virus dans la cellule hôte. Ce processus médié par les glycoprotéines d'enveloppe Gn et Gc. Les protéines Gn sont enchâssées dans la membrane lipidique à la surface des particules virales et occupent la partie la plus externe des particules virales. Elles sont les premiers points d'interaction avec les récepteurs situés à la surface des cellules. Deux types d'interactions ont été décrites jusqu'à présent. La première est médiée par les facteurs d'adhésion tels que DC-Sign (Lozach *et al.* 2011a), L-Sign (Léger *et al.* 2016b) et les héparanes sulfates (de Boer *et al.* 2012a) qui, permettent de déclencher son processus d'internalisation (Figure 22). Les récepteurs L-sign et DC-



sign sont respectivement présents à la surface des cellules épithéliales et dendritiques (Lozach *et al.* 2011a). Ils sont en particulier impliqués dans la captation d'antigènes (Pustynnikov *et al.* 2014) et l'activation de l'immunité. Les héparanes sulfates sont très présents dans les tissus interstitiels et sont aussi impliqués dans la captation de protéines et la mobilité cellulaire (Shi *et al.* 2011). Plus récemment, un récepteur spécifique a été décrit pour RVFV, il s'agit de la protéine Lrp1 capable d'interagir avec Gn (Ganaie *et al.* 2021a). Cette protéine ubiquitaire est présente à la surface de différents types cellulaires notamment les hépatocytes et les neurones qui sont des cibles du RVFV *in vivo*. La protéine Lrp1 est impliquée dans plusieurs processus tels que l'adhésion cellulaire et le recyclage intracellulaire des ligands, puisque dans l'endosome, à bas pH la protéine perd ses interactions avec son ligand et permet ainsi la dégradation des protéines associées à Lrp1 (Lillis *et al.* 2005). La stabilité de l'interaction entre Gn et Lrp1 permet le recrutement de divers facteurs cellulaires impliqués dans le processus d'internalisation puis le relargage dans le cytoplasme du corps des particules virales à la suite de l'acidification des endosomes (Ganaie *et al.* 2021a; Koch *et al.* 2021).

Le processus d'internalisation de la particule virale dans la cellule peut être médié par la voie des cavéolines. Une fois formée, la vésicule d'endocytose sera prise en charge par le système de recyclage des protéines de surface (Harmon *et al.* 2012). Une particule virale de RVFV a une dimension allant de 80 à 102 nm (Figure 23A) (Pettersson et Von Bonsdorff 1987) et les vésicules formées par le maillage de cavéolines ont un diamètre allant de 70 à 100 nm (Matthaeus et Taraska 2021) ce qui correspond à la limite basse de la taille des particules virales de RVFV. Ce mécanisme d'internalisation permet la formation de vésicules d'endocytose qui fusionnent avec les endosomes puis continuent leur processus de maturation au cours duquel, le pH va diminuer progressivement jusqu'à atteindre une valeur de 4 (lysosome). C'est au cours de cette phase que va se produire l'étape de fusion de la membrane lipidique de l'enveloppe virale avec celle de l'endosome tardif pour relarguer le génome viral dans le cytoplasme (Figure 22), celle-ci survient à un pH de 5,5 à 5,7 (de Boer *et al.* 2012). Ce processus est réalisé par le changement de conformation de la protéine Gc, dite protéine de fusion, qui va ensuite interagir avec la membrane de l'endosome pour initier la fusion des membranes (Koehler *et al.* 2013).

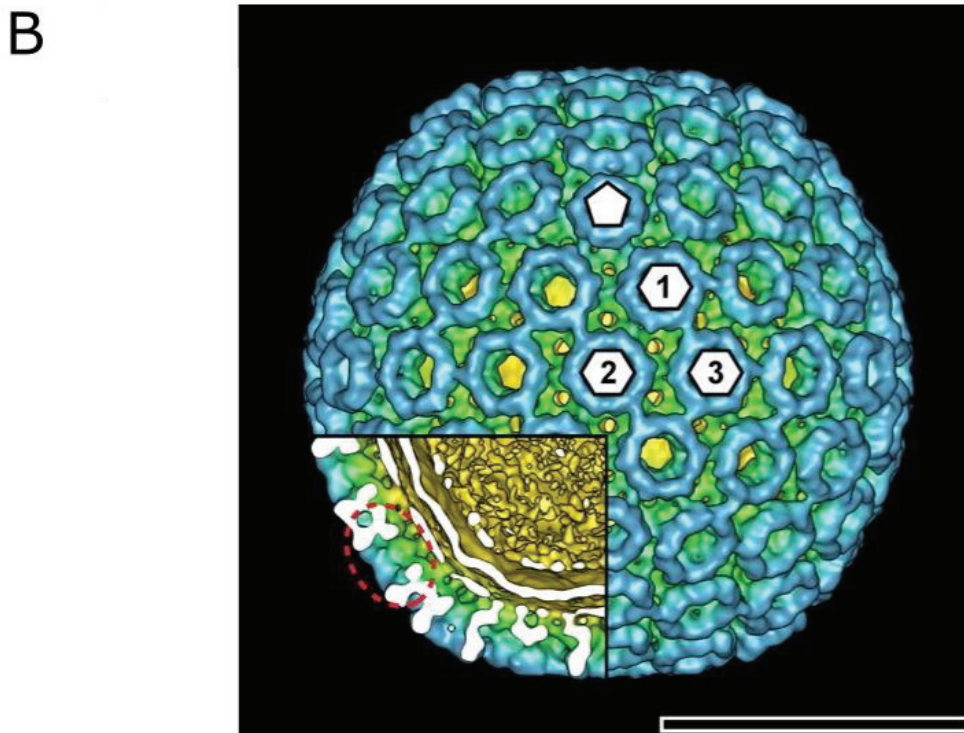
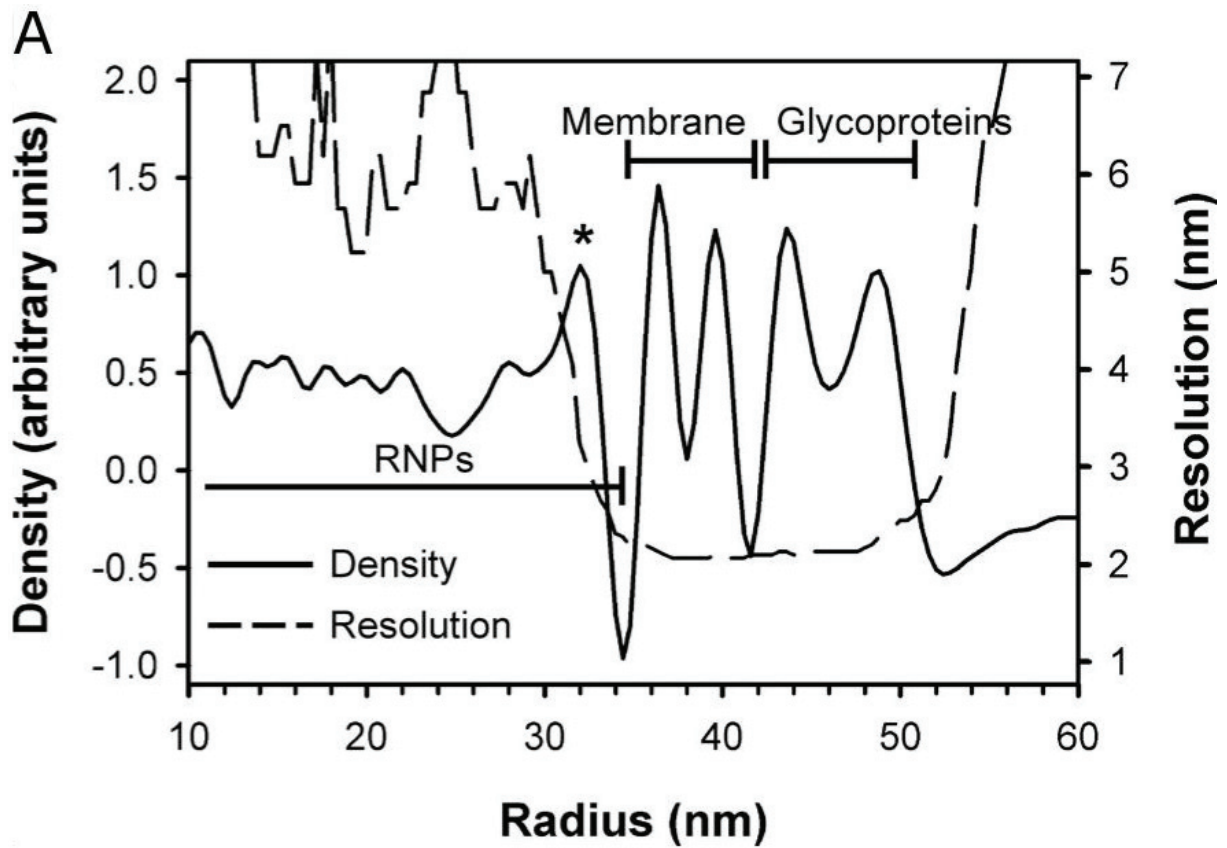


**Figure 22 : Cycle viral du RVFV à l'échelle d'une cellule.** La particule virale est internalisée via un mécanisme d'entrée cavéoline ou clathrine dépendant à la suite de son interaction avec des facteurs d'adhésion et l'un des récepteurs. A ce stade, l'endosome est appelé un endosome précoce qui va maturer pour devenir un endosome tardif dans lequel l'acidité sera augmentée et le processus de fusion, médié par la protéine Gc, aura lieu. Le génome viral est alors libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte. Dans le cytoplasme, le génome viral pourra alors être exprimé et permettre la synthèse des protéines virales, ces dernières participeront à l'étape de réplication du génome et formeront de nouveau un complexe ribonucléoprotéique. Les protéines d'enveloppe, elles, s'accumuleront dans l'appareil de Golgi qui est le lieu d'assemblage des particules virales en s'associant aux molécules d'ARN génomique. Les particules nouvellement formées vont transiter jusqu'à la membrane plasmique où elles seront relarguées dans le milieu intercellulaire.

Après libération des segments génomiques viraux, ceux-ci se retrouvent proche du centrosome et du RE du fait du trafic rétrograde des vésicules d'endocytose (Koch *et al.* 2021). Les protéines virales seront ensuite traduites dans le cytoplasme par la machinerie cellulaire. Les polyprotéines du segment M sont adressées au RE et après clivage des protéases cellulaires, les protéines Gn et Gc vont alors être transportées du RE à l'appareil de Golgi, transport au cours duquel elles vont subir des modifications post-traductionnelles (i.e. glycosylation) et ainsi acquérir une structure secondaire et tertiaire fonctionnelle (Spiegel *et al.* 2016). Les protéines NSs, N et L sont, quant à elles, synthétisées dans le cytoplasme. La formation des nouvelles particules virales a lieu au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 22) (Spiegel

*et al.* 2016). Schreur *et al* ont réalisé une approche de FISH (Fluorescence in situ hybridization) sur les trois segments génétiques et ont mis en avant un début de réplication au niveau du site d'infection, après la fusion des membranes, avant que les molécules du génome ne se répartissent dans la cellule. Le mécanisme de migration des molécules d'ARN reste encore à étudier (Schreur et Kortekaas 2016a). A la sortie de l'appareil de Golgi, les virions sont enfermés dans des vésicules de sécrétion qui se déplacent via le transport appelé antérograde. Ce transport est réalisé grâce au cytosquelette de microtubules et les kinésines et permet aux virions nouvellement formés d'être transportés jusqu'à la membrane plasmide où ils seront relargués en dehors de la cellule (Figure 22). Pour cela, ces vésicules vont employer le mécanisme d'exocytose permettant le relargage de leur contenu dans l'environnement intercellulaire (Tokarev *et al.* 2013).

Les particules virales ainsi formées à partir de cellules de mammifères ont un diamètre compris entre 84 et 102 nm (Pettersson et Von Bonsdorff 1987). En cryotomographie, ces virions présentent une partie centrale dense aux électrons composés des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) associé à la protéine L (RNP-L) condensés. Cette zone s'étend du centre de la particule virale jusqu'à environ 37 nm vers l'extérieur (Figure 23A). La couche suivante présente une faible densité aux électrons et est composée en très grande majorité de phospholipides. Elle est située à 38 et 41nm du centre de la particule virale. C'est dans cette bicouche lipidique que sont enchâssées les glycoprotéines Gn/Gc qui se regroupent à la surface de la particule sous la forme de capsomères. A partir du centre de la particule virale, son rayon maximal peut atteindre 51 nm. Ces glycoprotéines sont situées de 42 à 51nm du centre du virion (Figure 23A). Les capsomères de Gn/Gc forment une structure complexe composée d'hexamères entre-coupés de pentamères de Gn/Gc. En moyenne, un virion arbore 112 capsomères pour un total de 720 hétérodimères de Gn/Gc (Figure 23B) (Huiskonen *et al.* 2009).



**Figure 23** : La particule virale de RVFV (Huiskonen et al. 2009). (A) Résolution et distribution de la densité radiale au sein de la particule virale. La densité moyenne radiale (ligne continue) et la résolution (ligne pointillée) sont représentées en fonction du rayon. Les rayons correspondants à l'enveloppe de la glycoprotéine, à la bicouche lipidique et aux RNP sont indiqués. (B) Structure d'une particule virale de RVFV obtenue par cryotomographie, l'échelle est de 50nm.

### 1.3.3 Les protéines structurales

#### 1.3.3.1 Les protéines L, N et le complexe RNP

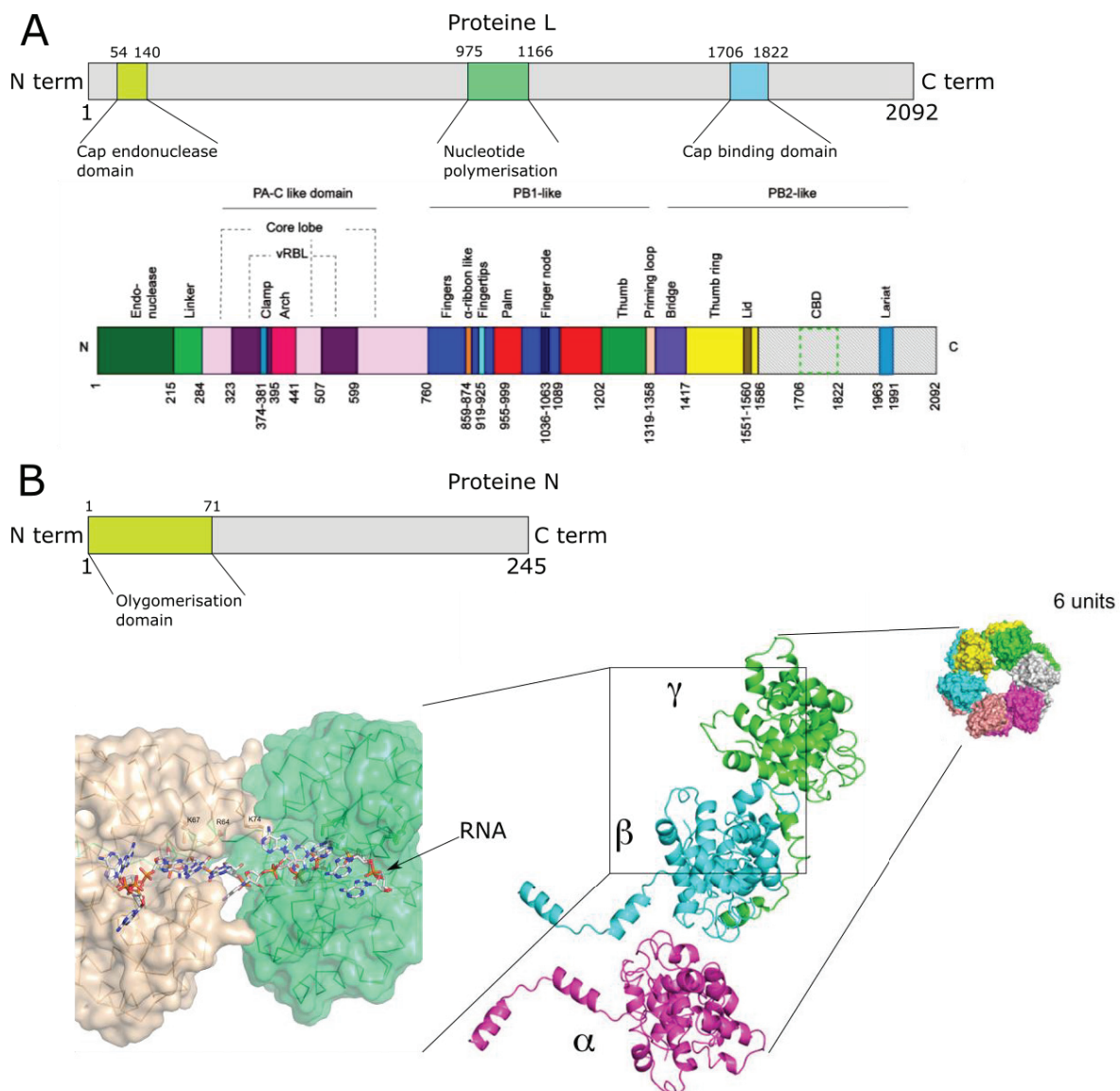
Comme mentionné précédemment, la protéine L est l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) du virus. Cette protéine de 2092 acides aminés (aa) et de 243 kDa est dotée de plusieurs domaines protéiques (Figure 24A) qui ont pu être identifiés par une analyse fonctionnelle de délétions de cette protéine, par cristallographie et résolution en Cryo-EM ainsi que par recherche d'homologie de structures (Chen *et al.* 2021).

Le premier domaine fonctionnel porte l'activité principale de la protéine, c'est-à-dire celle de l'hydrolyse des nucléotides (nt) triphosphates (NTP) pour permettre la polymérisation en 3'-OH de la molécule d'ARN viral. Ce domaine est de 191 aa et il est situé de la position 975 à 1166. Ce domaine joue un rôle critique dans le processus de réplication et de transcription des ARN viraux. Comme la majorité des virus à ARN simple brin de polarité négative, L ne possède pas d'activité « proof-reading » car elle ne possède pas d'activité exonucléase 3'->5' pour corriger les erreurs (Liang 2020). L'absence de cette activité favorise au cours de la réplication virale l'apparition de mutations ponctuelles surtout au niveau des régions riches en G/C ou en séquences répétées (Chen *et al.* 2021).

Deux autres domaines fonctionnels ont également pu être identifiés. Le domaine endonucléase, en position 1 à 214, qui permet le clivage des 5'-Cap des ARNm cellulaires (i.e. 10-20 premiers nt situés à l'extrémité 5' de ces ARNm) (Gogrefe *et al.* 2019; Patterson *et al.* 1984) et le domaine en position 1706 à 1822 qui est responsable de la capture et du transfert de ces coiffes sur les ARNm viraux, ce mécanisme est appelé « cap snatching ». Les travaux de Zhongzhou Chen *et al* ont permis de préciser la composition de ces domaines fonctionnels de L par homologie de structures (Chen *et al.* 2021). La protéine L joue aussi un rôle structural lorsqu'elle est dans la particule virale. En effet, celle-ci reconnaît la structure tige-boucle formée par les extrémités 5' et 3' de l'ARNv grâce à son domaine « fingertips » situé entre les positions 919 et 925 (Figure 24A) (Chen *et al.* 2021).

La protéine N est la nucléocapside du virus. Elle possède un rôle structural et fait partie du complexe ribonucléoprotéique appelé RNP avec l'ARN viral et la protéine L. La formation de ce complexe RNP est médié par une région globulaire de la

protéine N située entre la position 72 et 245 qui contient une cavité chargée positivement et présentant une affinité pour les ARNs. Un autre domaine, situé dans la région N-terminale (1 à 71) de la protéine, en dehors du domaine globulaire, est impliqué dans le processus d'oligomérisation des protéines N (Le May *et al.* 2005). En absence d'ARN, les protéines N génèrent une structure quaternaire composée de six protéines N (Figure 24B). Ferron *et al* ont résolu la structure quaternaire par cristallographie aux rayons X. Les auteurs proposent qu'une structure hexamérique du complexe de protéines N en forme de « donuts » serait importante pour permettre l'incorporation de l'ARN viral dans les cavités des protéines N (Ferron *et al.* 2011). Le complexe RNP présente un diamètre extérieur de 100Å et une hauteur de 45Å permettant de condenser l'ARN viral, un phénomène important pour la formation des particules virales. Les protéines N n'interagissent pas avec une séquence nucléotidique ou une structure spécifique des ARNv (Ferron *et al.* 2011).



**Figure 24 : Les protéines L, N et le complexe RNP.** (A) Cartes des domaines fonctionnels de la protéine L. i) Carte basée sur les données de la littérature et les homologies de séquences (Uniprot). ii) Carte détaillée issue des travaux de Zhongzhou Chen et al (Chen et al. 2021). (B) Carte des domaines fonctionnels de la protéine N et structure de l'oligomérisation des protéines N libres ou associées à l'ARN (Ferron et al. 2011). Les unités alpha (rose), beta (bleu) et gamma (vert) correspondent aux 3 protéines N différentes. L'ARN viral est représenté dans la cavité de deux protéines N.

### 1.3.3.2 Les glycoprotéines Gn, Gc et p78

Les protéines Gn et Gc subissent des modifications post-traductionnelles sous la forme de glycosylations. Il existe un site de N-glycosylation dans la protéine Gn (dont la séquence consensus est N-X-S/T) et quatre dans la protéine Gc (Figure 25) (Mellquist *et al.* 1998; Phoenix *et al.* 2016). Les N-glycosylations consistent en l'ajout d'un motif osidique composé de N-acétylglucosamine (GlcNAc), de mannose, de galactose et de fructose, et dont la taille et la complexité varient en fonction du

type cellulaire. Cette modification se déroule au niveau du RE et de l'appareil de Golgi (Phoenix *et al.* 2016). La protéine Gn possède 3 domaines nommés A, B et  $\beta$ -ribbon (Figure 26A). Les domaines A et B sont situés dans la partie la plus apicale de Gn et forment deux structures globulaires riches en hélices  $\alpha$  entrecoupées de régions flexibles non structurées. Ces deux domaines sont la cible d'anticorps neutralisants (Allen *et al.* 2018). La protéine Gn joue un rôle dans le processus d'attachement aux cellules hôtes et interagit ainsi avec le facteur d'attachement DC-sign ainsi qu'avec les domaines II et IV du récepteur Lrp1 (Lozach *et al.* 2011a; Ganaie *et al.* 2021a). La protéine Gc possède, quant à elle, trois domaines nommés I, II et III formés par des feuillettes- $\beta$  (Figure 26B) (Rusu *et al.* 2012). Gc peut se structurer sous deux formes : une forme repliée (dite de pré-fusion) ou une forme dépliée (dite de post-fusion). Dans sa conformation repliée, les domaines I et II de Gc interagissent avec le domaine  $\beta$ -ribbon de Gn, alors que le domaine III permet l'ancrage à bicouche lipidique du virus (Figure 26C) (Wu *et al.* 2017a). Le domaine  $\beta$ -ribbon a donc un rôle dans l'hétérodimérisation des protéines Gn et Gc, et il a été montré que Gn jouait aussi un rôle de protéine chaperonne de Gc en favorisant son repliement (Rusu *et al.* 2012). Le peptide fusion, localisé dans une boucle du domaine II, est une structure tridimensionnelle formée par un regroupement de plusieurs acides aminés: L779-W821-F826-V828 (Figure 26B) (Dessau et Modis 2013). Dans sa conformation de pré-fusion, le peptide fusion est masqué par le domaine B de Gn (Figure 26C) (Halldorsson *et al.* 2018b). Pour les peptides fusion de classe II, tels que celui du RVFV, la diminution du pH dans l'endosome induit un changement de conformation de Gc qui forme alors un trimère (Allison *et al.* 1995). Cette nouvelle structure quaternaire composée de trois protéines Gc dépliées expose le peptide fusion à l'extérieur de la particule virale et interagit avec la bicouche lipidique de l'endosome. Ceci provoque une réorganisation des phospholipides de la membrane des endosomes tardifs et sa fusion avec la membrane lipidique du virus (Filone *et al.* 2006; Guardado-Calvo *et al.* 2017).

A leur extrémité C-terminale, les deux protéines Gn et Gc possèdent une queue cytosolique (ou cytosolic tail, CT) d'une longueur de 70 et 5 aa, respectivement. La CT de Gc porte le motif de rétention au réticulum endoplasmique (TKKAS) tandis que celle de Gn contient le motif de rétention à l'appareil de Golgi (AFIRWIY et NREIGWM) (Habjan *et al.* 2009; Gerrard et Nichol 2002a; Carnec *et al.* 2014). Ces



motifs portés par Gn et Gc sont clés pour le transport et la localisation de l'hétérodimère Gn/Gc qui est formé dans le RE puis transporter dans l'appareil de Golgi (Carnec *et al.* 2014). Le CT de Gn est impliqué dans une interaction avec le complexe RNP pour l'assemblage des particules virales au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi (Överby *et al.* 2007; Wang *et al.* 2010). Une étude de la dynamique d'incorporation des segments dans les particules virales a montré qu'ils étaient incorporés à parts égales 2 heures post-infection alors qu'à 10h post-infection, les segments S, M et L sont respectivement présents dans 40%, 20% et 25% des particules virales (Schreur et Kortekaas 2016a). Par ailleurs, il a été aussi montré que les molécules d'ARN de polarité positive étaient encapsidées manière similaires à celles de polarité négative (Hayashi *et al.* 2021). Ces données indiquent donc que la reconnaissance et la discrimination des molécules d'ARN incorporées dans les particules virales sont peu stringentes pour RVFV.

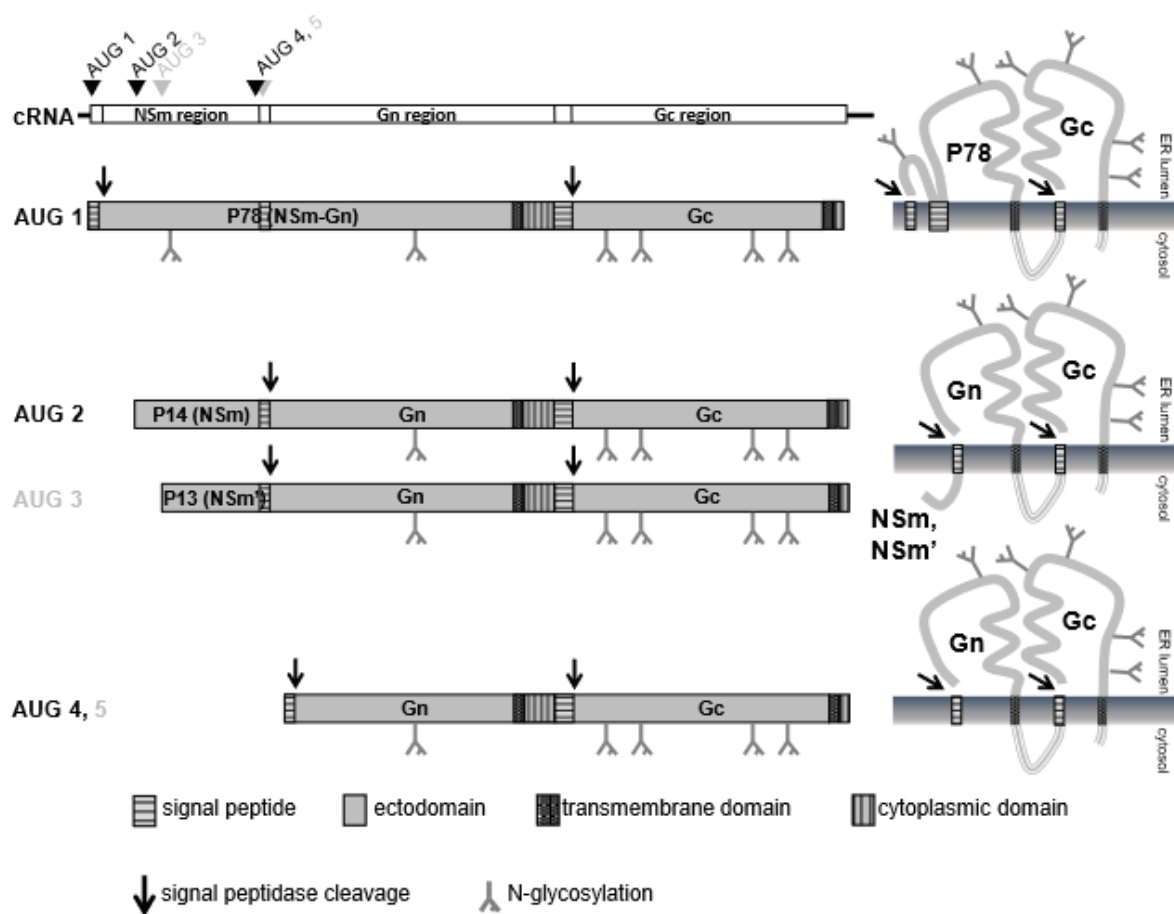
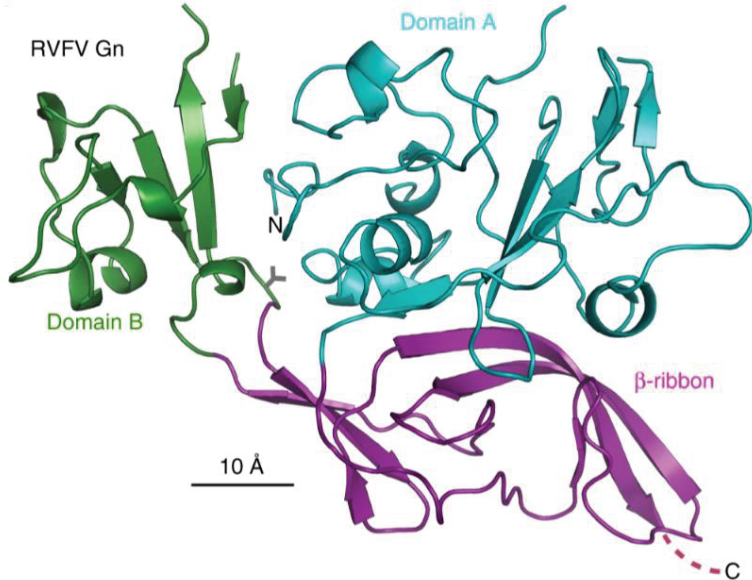
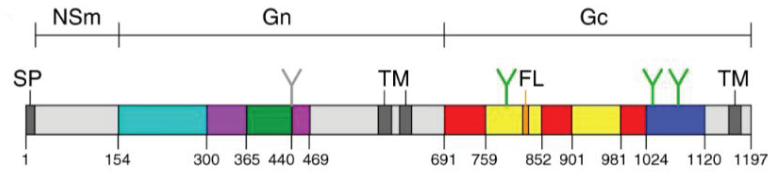


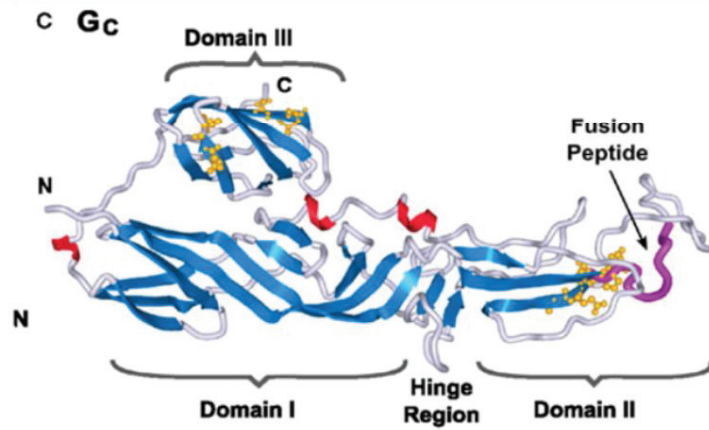
Figure 25 : Représentations schématiques de la topologie des protéines p78, Gn et Gc du RVFV (Spiegel *et al.* 2016).

Comme dit précédemment, il a été montré que la protéine p78 était efficacement incorporée à la surface des particules virales produites en cellules C6/36 (*Ae. Albopictus*) et que son expression est indispensable *in vivo* pour que la dissémination de RVFV chez les moustiques *Aedes aegypti* (Kreher *et al.* 2014; Weingartl *et al.* 2014). Tout comme les protéines Gn et Gc, la protéine p78 peut être glycosylée. Elle présente deux sites de N-glycosylation identifiés, un dans région commune avec la protéine NSm et l'autre dans celle de la protéine Gn (Figure 25). Dans le contexte de l'infection du RVFV chez les mammifères, deux études principales ont été menées pour élucider le rôle de la p78. Lors de la première étude, Kreher *et al* ont réalisé des « Knock out » (KO) des différents AUG du segment M dont l'AUG1. Ils n'ont pas observé d'effet significatif de l'absence de l'expression de P78 sur la virulence en modèle souris C57BL/6J après une infection par voie intrapéritonéale de 100 PFU (Kreher *et al.* 2014). La deuxième étude met en évidence une atténuation de la virulence du RVFV chez des souris CD-1 dans un contexte de surexpression de la protéine p78 (via une optimisation de la séquence Kozak de l'AUG1), alors que l'absence d'expression de la p78 s'est accompagnée d'une virulence accrue (Terasaki *et al.* 2021).

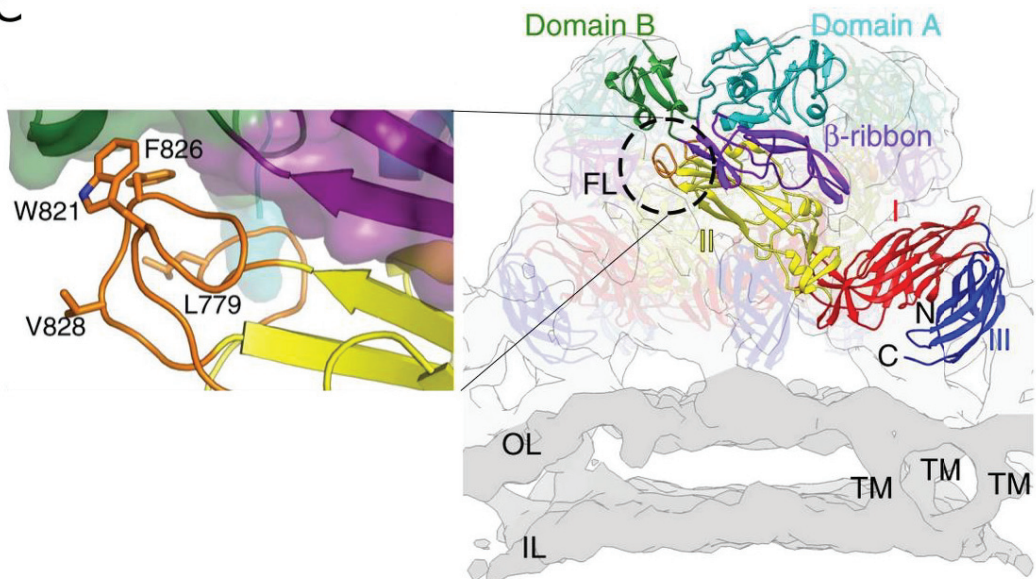
A



B



C



**Figure 26 : Structure de l'hétérodimère Gn/Gc.** (A) Organisation des domaines Gn et Gc codés par le segment M de RVFV domaine A en bleu clair, domaine B en vert, B-ribbon en violet. Les régions transmembranaires (TM), le peptide signal (SP) et les positions des glycanes (Y) sont indiquées. La structure cristallisée de Gn du RVFV est également présentée (Halldorsson et al. 2018b). (B) Structures tertiaire de Gc dans sa conformation post-fusion dans lesquelles sont illustrés les B-brins (bleu), les  $\alpha$ -hélices (rouge) et les domaines sans structure secondaire (gris) (Rusu et al. 2012). Le peptide de fusion est représenté en violet. (C) Structure de l'hétérodimère Gn/Gc. Les domaines de Gc sont colorés de la façon suivante : le domaine I en rouge, le domaine II en jaune, le domaine III en bleu et la boucle du peptide fusion (FL) en orange. Le peptide fusion est masqué par le domaine B de Gn. (Halldorsson et al. 2018b).

### 1.3.4 Les protéines non structurales

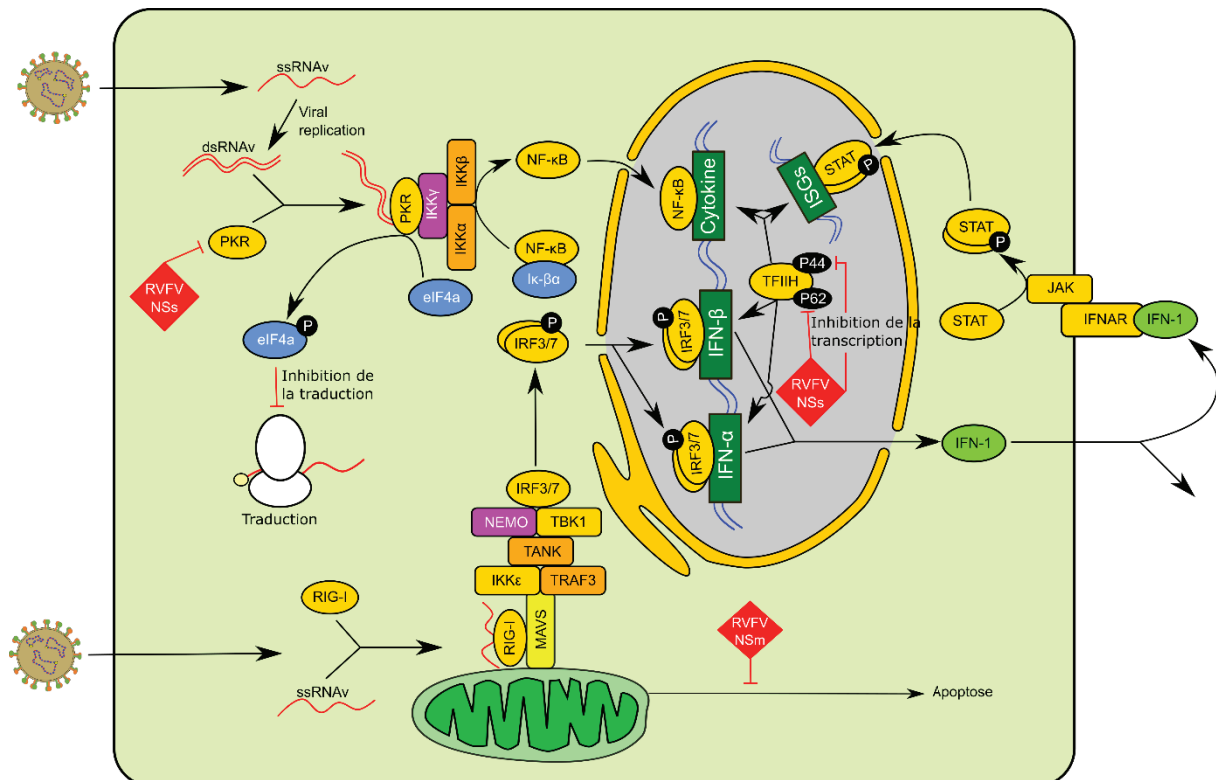
#### 1.3.4.1 La protéine NSs

La protéine NSs est considérée comme le facteur de virulence principal de RVFV. Elle protéine NSs est longue de 265 aa et a une taille d'environ 31 kDa. Elle est localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau des cellules infectées. Elle a la particularité de former, via un motif  $\Omega$ XaV, des structures en filaments dans le noyau (Yadani et al. 1999; Cyr et al. 2015). Ces filaments de NSs interagissent avec la sous-unité p44 du facteur de transcription TFIIH et empêcherait ainsi sa formation (Le May et al. 2004). Il a aussi été montré que la protéine NSs était capable d'induire la dégradation de la sous-unité p62 de TFIIH (Kalveram et al. 2011). L'ensemble de ces mécanismes aboutissent à une inhibition générale de la transcription dans les cellules infectées par RVFV (Figure 27). Il a aussi été proposé que la protéine NSs puisse inhiber l'activation du promoteur du gène de l'IFN $\beta$  en interagissant avec la protéine SAP30 (Sin3A Associated Protein 30) (Weill et al. 2003; May et al. 2008). L'ensemble de ces fonctions permet donc une inhibition efficace des voies de l'interférons. La protéine NSs agit également sur la protéine PKR en provoquant sa dégradation par le protéasome ce qui favorise une traduction efficace des protéines virales (Mudhasani et al. 2016; Habjan et al. 2009; Kalveram et al. 2013).

#### 1.1.1.1 La protéine NSm

La protéine non structurale NSm est issue de la maturation des polyprotéines codées par le segment M. Celle-ci peut être produite en deux isoformes à partir de deux codons d'initiation de traduction différents : AUG 2 et AUG 3. Les deux protéines appelées NSm et NSm' font 14,4 kDa et 12,6 kDa respectivement. Le rôle de la protéine NSm n'est pas encore complètement élucidé. En effet, il a été montré que l'expression de ces deux protéines n'était pas indispensable pour la réplication virale *in vitro* et la virulence chez la souris (Gerrard et al. 2007; Bird et al. 2007). En revanche, il a été montré qu'un virus muté au niveau des AUG 2 et 3 se répliquait

moins efficacement dans les cellules RAW 246.7 (lignée de macrophages murins) et était fortement atténué chez des souris C57BL/6, en comparaison de la souche non mutée à cette position (Kreher *et al.* 2014). Les protéines NSm/NSm' du RVFV possèdent, dans la région C-terminale, un domaine transmembranaire contenant un motif d'adressage à la membrane externe de la mitochondrie (MOM), et il a été montré que NSm avait une activité anti-apoptotique *in vitro* (Figure 27) (Terasaki *et al.* 2013; Won *et al.* 2007b).



**Figure 27 : Mécanismes cellulaires modulés par les protéines non structurales de RVFV.** La protéine NSs inhibe la transcription cellulaire en (i) interagissant avec p44 et (ii) en induisant la dégradation de p62. Elle peut aussi inhiber l'activation du promoteur du gène de l'IFNβ. La protéine NSs promeut aussi la dégradation de la protéine PKR, facilitant ainsi une traduction efficace des protéines virales. La protéine NSm possède une activité anti-apoptotique.

## 2 Les objectifs de thèse

L'Afrique de l'Ouest, et plus particulièrement le Sénégal et la Mauritanie, connaît une circulation active de RVFV depuis 1987. Les caractéristiques multifactorielles de l'émergence de la FVR sont complexes et encore mal connues dans cette région ce qui ne permet pas de concevoir des stratégies de surveillance et de contrôle de la FVR adaptées et efficaces. Le projet multidisciplinaire FORESEE (AMI No 6, métaprogramme GISA INRAE, 2018-2021), dans lequel mes travaux de thèse sont

intégrés, a pour but de caractériser les facteurs impliqués dans l'émergence et la diffusion de RVFV dans cette région. Les axes de recherches se sont concentrés sur les facteurs environnementaux et climatiques (pluies, inondations...), la mobilité animale et un facteur souvent moins étudié, le virus lui-même. Pourtant, les propriétés biologiques de RVFV peuvent moduler sa transmission en jouant, par exemple, sur sa capacité à infecter plusieurs hôtes, à induire une forme asymptomatique, des signes cliniques légers ou sévères, ou à être transmis par contact ou par les arthropodes.

Dans ce contexte, ma thèse a pour objectif d'identifier les marqueurs moléculaires viraux impliqués dans la pathogénicité et la transmission du RVFV. Dans ce but, deux souches de terrain ont été sélectionnées. La souche MRU25010-30 a été isolée d'un dromadaire pendant l'épidémie de 2010 qui a eu lieu dans la région désertique du nord de la Mauritanie et où, pour la première fois les camélidés ont présenté des formes cliniques sévères et mortelles de FVR. Parallèlement, la souche MRU2687-3 a été isolée d'une chèvre lors de l'épidémie de 2013-2014 qui a impacté une large zone géographique allant du sud de la Mauritanie à Dakar, la capitale du Sénégal.

Au cours de ma thèse, j'ai tout d'abord caractérisé la séquence génomique de ces deux souches de terrain. J'ai ensuite étudié leur virulence en modèle murin en testant de deux routes d'inoculation mimant une transmission par les arthropodes (voie sous-cutanée) ou par contact avec les fluides contaminés (voie intranasale). Enfin, j'ai développé un système de génétique inverse de ces deux souches afin d'identifier *in vitro* les déterminants viraux impliqués dans les différences de réplication observées entre ces deux souches de RVFV.

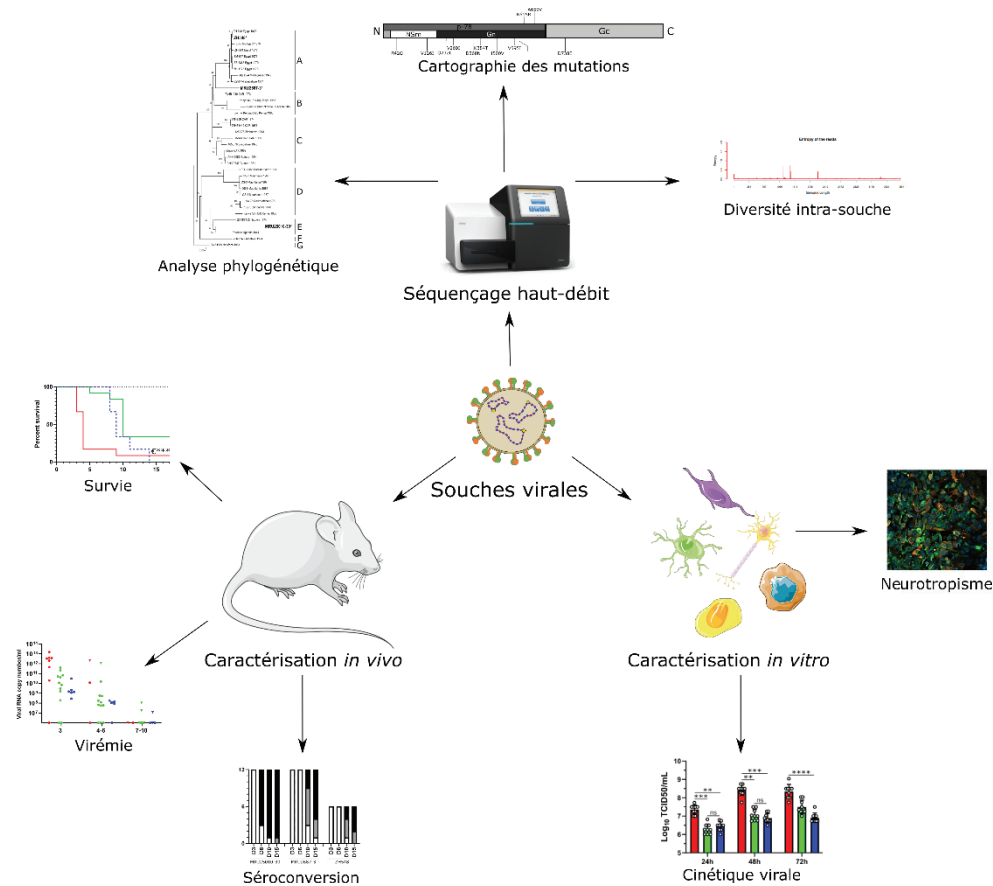
### 3 Résultats (Partie 1)

Deux souches de RVFV, isolées au cours de deux épidémies différentes, sont étudiées dans cette première partie des résultats.

Le premier épisode est survenu en 2010 dans la région désertique de l'Adrar à la suite de fortes pluies inhabituelles dans cette région du Nord de la Mauritanie. Lors de cette épidémie, des signes cliniques sévères accompagnés d'un fort taux de mortalité chez les dromadaires ont été décrits pour la première fois (El Mamy *et al.* 2011; El Mamy *et al.* 2014). Plusieurs souches de RVFV ont pu être isolées au cours de cette période, notamment la souche MRU25010-30, obtenue à partir du sérum d'un dromadaire. Il est important de noter qu'au moins 30 cas d'infection chez l'Homme ont aussi été rapportés en 2010 dans cette région (Faye *et al.* 2014).

Le second épisode d'intérêt a eu lieu en 2013-2014 en Mauritanie en concomitance avec celui décrit au Sénégal où plusieurs foyers humains et animaux ont été répertoriés sur l'ensemble du pays, notamment dans la zone urbaine de Dakar (Sow *et al.* 2016). Lors de ce second épisode, la souche MRU2687-3a été isolée à partir du foie d'un avorton de chèvre dans la localité de Bababé, située le long du fleuve Sénégal qui constitue la frontière entre le Sénégal et la Mauritanie. Une enquête sérologique réalisée en 2013 a révélé une séroprévalence d'anticorps de type IgM anti-RVFV chez 73% des petits ruminants testés dans la région de Bababé indiquant une circulation intense du virus (Rissmann *et al.* 2017).

Des séquences obtenues par la méthode de Sanger en amont de mes travaux de recherche (i.e. le segment S de la souche MRU2687-3 et les segments S et M d'une souche isolée chez un dromadaire en 2010, MRU25010-24, provenant du même foyer épidémique que la souche MRU25010-30) indiquaient que les souches MRU25010-30 et MRU2687-3 pouvaient être phylogénétiquement distinctes. La virulence de ces souches a ensuite été testée en modèle murin. Une première série d'expériences a montré que la souche MRU25010-30 était plus virulente que la souche MRU2687-3, validant ainsi le fait que ces deux souches virales et les outils méthodologiques disponibles associés allaient me permettre d'atteindre les objectifs de ma thèse.



**Figure 28 : Approches expérimentales utilisées dans ce chapitre pour caractériser moléculairement et phénotypiquement les isolats de terrain RVFV.**

Les résultats de cette première partie sont rassemblés dans l'article intitulé « Comparative study of two Rift Valley fever virus field strains circulating in Mauritania in 2010 and 2013 reveals the hypervirulent nature of the MRU25010-30 strain isolated from camel ». Dans ce premier article, nous avons mis en place un ensemble d'approches expérimentales complémentaires allant du séquençage profond et de l'analyse *in silico* du génome des souches, à la caractérisation de leur virulence *in vivo* et de leur capacité répliquative *in vitro* (Figure 28). La souche ZH548, isolée lors d'une épidémie de FVR de grande envergure (600 décès humains) survenue en Egypte (1977), a été incluse dans l'ensemble des analyses que j'ai mené, comme souche de référence.

Dans un premier temps, je me suis attaché à générer la séquence complète des trois segments S, M et L de chacune de ces trois souches. Le séquençage à haut débit a été réalisé en collaboration avec le centre collaborateur de l'OMSA (Organisation mondiale de la santé animale ; anciennement OIE, Office International des Épidémiologies) "Viral Genomics and Bioinformatics", CVR (Center for Virus Research),



situé à Glasgow, au Royaume-Uni. J'ai ensuite été amené à compléter et valider les séquences des régions 5' et 3' non-traduites ainsi que de la région inter-génique du segment S par des approches de RACE-PCR, puis à réaliser une analyse comparative *in silico* des séquences obtenues (alignements, phylogénie, ...).

Les expériences *in vivo* en modèle murin ont été réalisées, là aussi en collaboration étroite, avec l'équipe du Dr Philippe Marianneau qui possédait l'expertise, les infrastructures et les autorisations nécessaires (ANSES, Unité de Virologie, Lyon, France). Elles ont pour but d'évaluer l'impact de la diversité génétique mais aussi de la voie d'inoculation (intranasale ou sous-cutanée) sur la pathogénicité de nos 2 souches d'intérêt. En effet, nous savons que la transmission du virus chez l'Homme est possible à la fois par contact direct avec des fluides contaminés et via des piqûres de moustiques infectés pour le RVFV (Bird *et al.* 2009). Avec les premiers résultats de cette approche, nous avons conçu de nouvelles séries d'expériences afin d'affiner notre connaissance de la pathogénèse induite par ces souches durant les phases précoce de l'infection.

Enfin, en m'appuyant sur les résultats obtenus en modèle murin, j'ai caractérisé les capacités répliquatives et le tropisme cellulaire de ces 2 souches dans des modèles cellulaires humains, notamment des cellules hépatiques (HepaRG) et des cellules souches pluripotentes différenciées en cellules neurales. Ce dernier modèle cellulaire a été développé par l'équipe du Dr Bertrand Pain, Institut Cellule Souche et Cerveau (SIBRI), Lyon, France.

# Comparative study of two Rift Valley fever virus field strains circulating in Mauritania in 2010 and 2013 reveals the hypervirulent nature of the MRU25010-30 strain isolated from camel

Mehdi Chabert<sup>1,2,3</sup>, Sandra Lacôte<sup>4</sup>, Philippe Marianneau<sup>4</sup>, Marie-Pierre Confort<sup>1</sup>, Baba Doumbia<sup>5</sup>, Mohamed Bezeid Ould El Mamy<sup>6</sup>, Moustapha Lo<sup>7</sup>, Sreenu Vattipally<sup>8</sup>, Ana da Silva Filipe<sup>8</sup>, Bertrand Pain<sup>9</sup>, Catherine Cêtre-Sossah<sup>2,3</sup>, Frédérick Arnaud<sup>1</sup> et Maxime Ratinier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IVPC UMR754, INRAE, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, EPHE, PSL Research University, F-69007 Lyon, France.

<sup>2</sup>CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier Cedex, France

<sup>3</sup>ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France

<sup>4</sup>ANSES, Virology Unit, F-69007 Lyon, France

<sup>5</sup>Direction des Services Vétérinaires, Nouakchott, Mauritania

<sup>6</sup>ONARDEP, Nouakchott, Mauritania

<sup>7</sup>ISRA-LNERV, Dakar, Senegal

<sup>8</sup>MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, UK.

<sup>9</sup>Univ Lyon, Université Lyon 1, INSERM, INRA, Stem Cell and Brain Research Institute, U1208, USC1361, 69500 Bron, France

## Abstract

Rift Valley fever (RVF) is one of the major viral arthropod-borne zoonotic diseases in Africa. In recent decades, RVFV, the causative agent of RVF, has been responsible for multiple outbreaks in West Africa with important consequences on human and animal health. In this study, we characterized two field strains isolated in Mauritania during two distinct outbreaks. The first epidemic in 2010 appeared after an episode of heavy rains in the desertic region of Adrar and showed, for the first time, severe clinical signs, including death, among dromedary camels. The second one, in 2013-2014 took place throughout Senegal country and the southern part of Mauritania. The deep sequencing of the genome of the two viral strains isolated from these two outbreaks revealed that they clustered into two different genetic lineages. Moreover, RVFV strain isolated in camel (MRU25010-30) prove to be more virulent in BALB/c mice compared to MRU2687-3 regardless of the route of inoculation (subcutaneous or intranasal). These results are supported by the stronger replication dynamics of MRU25010-30 in various cell culture models compared to MRU2687-3. Altogether, the data obtained in this study offer new avenues to unveil viral molecular determinants modulating RVFV pathogenicity.

## Introduction

Rift Valley fever virus (RVFV) is an arbovirus transmitted by mosquitoes, mostly belonging to the *Aedes* and *Culex* genera (Linthicum *et al.* 1985; Seufi et Galal 2010). RVFV belongs to the Phlebovirus genus within the Phenuiviridae family of the

*Bunyavirales* order. Only one serotype is described for RVFV and, although genetic diversity is considered as low (between 1 and 5%), it is possible to separate RVFV strains into seven distinct genetic lineages (named from A to G) (Bird *et al.* 2007). This classification is based on the full-length sequences of the three viral genomic segments named by their size. The Large segment (L, 6404 nucleotides, nts) encodes for the L protein, the viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp). This protein is involved in the replication of the viral genome but also its transcription (Liang 2020). The Medium segment (M, 3884 nts) allows the expression of several polyproteins that are subsequently matured by cellular proteases, such as signal peptidase, into functional viral proteins (Spiegel *et al.* 2016). Depending on the nucleotides used as start codons, the segment M can be translated into five in-frame polyproteins encompassing: i) one long glycoprotein, named p78 or LGp (AUG1), ii) two non-structural proteins, NSm and NSm' (AUG2:3) and iii) two surface glycoproteins, Gn and Gc (AUG4/5) involved in the cell entry and morphogenesis of the viral particles (Spiegel *et al.* 2016). The NSm proteins are located at the outer membrane of the mitochondria and display an antiapoptotic activity (Won *et al.* 2007b). Moreover, mutant viruses unable to express NSm/NSm' are attenuated in Wistar-furth rats and C57BL/6J mice showing the NSm is virulent factor of RVFV (Bird *et al.* 2007; Kreher *et al.* 2014). The p78 is a glycoprotein known to be incorporated at the surface of insect-derived virions and it is essential for RVFV dissemination in mosquitoes (Kreher *et al.* 2014; Weingartl *et al.* 2014). A recent study showed that the quantity of p78 produced by RVFV impacts virus replication rates in human macrophages as well as its virulence in infected mice (Terasaki *et al.* 2021). The Small segment (S, 1604 nts) possesses two ORFs and uses an ambi-sense coding strategy (Giorgi *et al.* 1991). The first ORF situated on the positive strand encodes for the nucleoprotein (N) that interacts with the viral RNA and is involved in the packaging and contributes to the viral replication and transcription (Gauliard *et al.* 2006). The second one is located in the negative strand and allows the expression of the non-structural protein S (NSs) which is the main virulence factor of RVFV (Lau et Weber 2020; Cyr *et al.* 2015; Billecocq *et al.* 2004).

Rift Valley fever (RVF), which is the disease caused by RVFV, primarily affects domestic and wild ruminants such as goats, sheep, cattle and camels. When symptomatic, the infection often causes a febrile syndrome characterized by fever at the third day of infection (Daubney *et al.* 1931). Some animals may develop necrotic foci and haemorrhages in the liver leading to fulminant hepatitis, often associated with bleeding of the digestive tract (Faburay *et al.* 2016). In animals surviving this initial phase, a neurological forms of the disease may occur with a significant neurodegeneration and degradation of the retina (Busquets *et al.* 2010). RVF is also characterised by a high abortion rate in pregnant females (Oymans *et al.* 2020). Humans can also be infected by RVFV, due to exposure to contaminated fluids during, for example, slaughter or care of sick animals. In humans, the disease ranges from asymptomatic to mildly severe, characterised by a febrile syndrome (Daubney *et al.* 1931; Sabin et Blumberg 1947). Severe forms are characterised by the appearance of haemorrhagic fever during the first peak of fever, or by the appearance of a second wave of fever associated with liver damage and or the appearance of neurological syndrome characterised by convulsions and

meningoencephalitis (Daubney *et al.* 1931; Ikegami *et al.* 2011; Smithburn *et al.* 1949). As it is described in small ruminants, the retina can also be affected leading to complete or partial blindness (Smith *et al.* 2010). Mice are particularly susceptible to RVFV infection and therefore represent a good model to study RVFV pathogenicity as they develop symptoms comparable to that observed in young ruminants or humans with the exception of the haemorrhagic syndrome (Smith *et al.* 2010; Ikegami *et al.* 2011). Interestingly, despite low RVFV genetic diversity, it has been shown that RVFV virulence can be modulated by genetic lineages in the CD-1 mouse model (Ikegami *et al.* 2017b).

RVFV is endemic in several African countries (Bird *et al.* 2009). Since its discovery in Kenya in 1930 (Daubney *et al.* 1931), it caused major epidemics such as in South Africa in 1951 (Pienaar *et al.* 2013), in Egypt in 1977 (Meegan 1979) and in Mauritania and Senegal in 1987 (Digoutte *et al.* 1989). In Senegal, RVFV was first detected in 1967 in Kedougou and, since then, recurrent epidemics interspersed with inter-epidemic periods have occurred (Fontenille *et al.* 1998; Arsevska *et al.* 2016). Mauritania has also been affected by several RVFV outbreaks since 1987. In 2010, unexpected heavy rainfalls in the northern Adrar desertic region have been followed by an important RVFV outbreak with unexpectedly severe symptomatic forms and even death within the population of camelids that were considering asymptomatic RVFV carriers (El Mamy *et al.* 2011). Two types of severe forms have been described: (i) an hyperacute form leading within 24 hours to a sudden death and (ii) an acute form causing fever, oedema on the neck, ocular discharge, blindness, nervous symptoms and abortion as well as haemorrhagic symptoms leading to the death of the animal in few days (El Mamy *et al.* 2011). This RVFV epidemic also resulted in the death of 13 peoples among 63 humans patients (El Mamy *et al.* 2011). Two years after, several southern regions of the country were again affected by RVF, and the circulation of the virus lasted until 2015, concomitantly with a RVFV re-emergence in Senegal (2013-14) (Sow *et al.* 2016; 2014). The last recorded outbreak occurred in 2020, emphasizing that RVFV strains are actively circulating in West Africa (Barry *et al.* 2022; Boushab *et al.* 2016).

To date, studies aiming to characterize circulating RVFV strain in West Africa are still very limited (Ndiaye *et al.* 2016). Here, we characterized, through *in silico*, *in vivo* and *in vitro* approaches, two RVFV field strains isolated in Mauritania in 2010 (MRU25010-30, camel serum) and in 2013 (MRU2687-3, goat liver). We fully sequenced these two strains, assessed their virulence in BALB/c mice and determined their viral growth kinetics in several cell types. Our data show that mice infected with the RVFV strain isolated from the goat displayed a longer life span than those injected with the RVFV strain obtained from the camel. Moreover, we found that the strain isolated from the camel is extremely virulent, it replicates at very early stages and with higher rates than the one isolated from the goat.

## Materials and methods

### Cell culture

A549, A549Npro (kindly provided by Richard E. Randall, University of St Andrews, UK), BSR (a clone of BHK21 cells, obtained from Karl K. Conzelmann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany) (Buchholz, Finke, et Conzelmann 1999) and VeroE6 were cultivated in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). HepaRG (hepatic cell line) were grown in William's E medium supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine, 5 µg/mL insulin, 0.5 µM hydrocortisone.

Human embryonic fibroblasts (HEF) were kindly provided by Dr Odile Boespflug-Tanguy (AP-HP, Robert Debre hospital, Department of Neuropediatrics and Metabolic Diseases, National Reference Center for Leukodystrophies, Paris, France). HEF were grown in fibroblast medium containing DMEM/F-12 (Life Technologies, 21331-020), 10% fetal calf serum (Gibco, 10270), 1X penicillin-streptomycin (Gibco, 15140122), 2mM L-glutamine (Gibco, 25030-024). HEF were reprogrammed into hiPSC using CytoTune™ Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies, A13780-01), according to the manufacturer's instructions. Once isolated, clones were amplified, characterized, and registered to the Human pluripotent stem cell registry (<https://hpscereg.eu/>) under number N° DC-2020-3895. hiPSCs were declared through the Codecoh N° 2021-4404). hiPSC were maintained in mTeSR1 (Stemcell, 05851-05852) on matrigel coating (Corning, 354277) and were dissociated with dispase (Stemcell 07923) according to the manufacturer's instructions. Two independent isolates were used.

Once dissociated, cells were plated at 150 000 cells in a well of a 12 wells plate into Neural induction medium (NIM) medium composed of DMEM/F-12 complemented with 2mM L-Glutamine, 1000 U/mL Penicillin-Streptomycin, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 1mM 2-Mercaptoethanol and 1% N-2 Supplement. Medium was changed every two days. At day 7, cells were changed, and Neural stem medium added. This medium is composed of DMEM/F-12 complemented with 2mM L-Glutamine, 1000 U/mL Penicillin-Streptomycin, 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 1mM 2-Mercaptoethanol and 1% N-2 Supplement. Medium supplemented with 20ng/ml of human recombinant basic Fibroblast Growth Factor (hrFGF) (154 a.a., Peprotech) and 20ng/mL of murine recombinant Epidermal Growth Factor (mrEGF) (Peprotech). Medium was changed every two days. At day 14, cells were changed and NIM was added again but additioned with 0.5µM of all-trans retinoic acid (ATRA) (Sigma) for 4 days with a change on day 16. At day 18, NIM was added but complemented with 0.5µM ATRA, 2% B-27 Supplement, 100 ng/mL of human recombinant Sonic Hedged Hog (hrSHH) (StemCell Technologies). This medium was used for 10 days with a change every two days. At day 28, a new modification was brought by using NIM complemented with 2% B-27 Supplement, 100 ng/mL hrSHH and 10 ng/ml hrFGF for 12 days with a change every two days. At day 40, the medium was adjusted again for maturation of the cells using NIM medium supplemented with 2% B-27 Supplement, 100 ng/mL hrSHH, 10 ng/mL human recombinant Platelet derived growth factor-AA (Peprotech) and 40 ng/mL of 3,3',5-Triiodo-L-thyronine

sodium salt (Sigma-Aldrich). Medium was changed every two days until their use for infection and analysis. If not precised, all components were purchased from Thermo-Fisher. All cell lines were grown in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C (Tailor *et al.* 2013).

### Viruses culture

The MRU25010-30 strain originating from Lemsayddi, in the desertic Adrar region of Mauritania has been isolated from the serum of a sick camel during the 2010 outbreak (El Mamy *et al.* 2014). The MRU2687-3 strain originating from Bababe, in the Brakna region of Mauritania along the Senegal river, has been isolated from the liver of an aborted goat in 2013 (Sow *et al.* 2016). These two strains have been passaged twice in VeroE6 before being used in this study. ZH548 strain has been isolated from the serum of a febrile human patient during the 1977-1978 outbreak in Egypt. The number of cell culture passages of ZH548 strain used in this study is undetermined and is used in this study as a reference strain.

All RVFV strains stocks have been obtained by infecting VeroE6 cells grown in DMEM supplemented with 4% FBS. Two- or three-days post infection, the supernatants were harvested, clarified by centrifugation at 500g for 5 minutes (4°C), aliquoted and stored at -80°C. The titrations were performed by plaque assays using VeroE6 cells.

### RACE-PCR

Viral RNA of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 viral stocks were extracted using the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PolyA tails were added to the viral genomic or antigenomic RNA molecules using the mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription Kit (Ambion, France) according to the manufacturer's instructions. The reverse transcription was performed using the PrimeScript RT reagent kit (Takara) with a primer oligo-d(T)-AP. PCR DNA amplifications were performed with CloneAmp HiFi PCR premix (Takara) using Primer-AP (5' GACCACGCGTATCGATGTCGAC 3') and specific primer for each ends (5' UTR S: 5' TAGTCCCAGTGACAGGAAGC 3'; 3' UTR S: 5' GGTATCCTGGGAGGACCAT 3'; 5' UTR M: 5' GCCATGGTTTCTCTCCCTAT 3'; 3' UTR: 5' TAGGCGGGAAGCAGGGGG 3'; 5' UTR L: 5' CTGGAATGCACCTCTTTCATCTC 3'; 3' UTR L: 5' TGGATGTTAGTGGCCCTTACG 3'). The PCR amplicons were gel purified with NucleoSpin gel and PCR clean-up kits (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's protocol, and subsequently sequenced by Sanger method.

### Deep-sequencing analysis

RNA from RVFV stocks used to infect mice have been extracted with trizol reagent, further purified using Direct-zol RNA MiniPrep kit (ZYMO RESEARCH). RNA was reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen, USA) and the Random hexamers and a NEB Second Strand Synthesis kit (New England BioLabs) were used to generate double-stranded DNA. For subsequent library preparation, we used the KAPA Library Prep kit (KAPA Biosystems) with index tagging. DNA was amplified for 16 cycles by polymerase chain reaction using KAPA HiFi HotStart (KAPA Biosystems) and NEBNext Multiplex Oligos (oligonucleotides) for Illumina Index Primer Sets 1 and 2 (New England BioLabs). Libraries were quantified by Qubit (ThermoFisher), sized by

TapeStation (Agilent), and pooled at equimolar concentrations. For capture, pooled libraries were enriched with the NimbleGen SeqCap EZ system (Roche) and then sequenced on an Illumina.

### Bioinformatic analysis

Raw next generation sequencing data was quality checked using FastQC (v 0.11.9) program and low quality (Phred score < 30) and short reads (read length < 75nt) were filtered using Trim Galore (v 0.6.5). Filtered data were mapped to reference genome sequences using a mapping program Tanoti (<https://github.com/vbsreenu/Tanoti>) and consensus sequences were generated using SAM2CONSENSUS (<https://github.com/vbsreenu/Sam2Consensus>).

Since the depth of the data was low at the terminal, RACE-PCR results were used for extending the ends of the genomes.

### Phylogenetic and protein analysis

Nucleotides and proteins sequences of the three genomic segments S, M and L were aligned using ClustalW program (Thompson, Higgins, et Gibson 1994) or codon method in MEGA X software (Kumar *et al.* 2018). The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood (ML) method and general time reversible model (GTR) implemented in the above-mentioned MEGA X (Nei et Kumar 2000). To compare the genetic relatedness of the sequenced viruses, phylogenetic analyses were performed against a panel of 33 ancestral complete nucleotide sequences described by Bird and colleagues (Bird *et al.* 2007) and SPU77/04 strain sequences (Namibia, 2004) (Grobbelaar *et al.* 2014).

### Ethical statement

The experimental protocols complied with the regulation 2010/63/CE of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and as transposed into French law. These experiments were approved by the Anses/ENVA/UPEC ethics committee and the French Ministry of Research (Aparis n° 2018120710406718 (#17985)).

### *In vivo* virulence studies

Six to eight weeks old female BALB/c mice (purchased from Janvier Labs) were infected either intranasally (IN) by placing 20µL close to the nasal cavity, or subcutaneously (SC) with 100µL of media. RVFV doses used in this study was either 10 PFU (10) or 1000 PFU (10<sup>3</sup>). Mock group contains 3 animals, each RVFV-infected group contains 6 animals (MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548) and experiment was repeated twice except for ZH548. Weight and temperature of mice were monitored every day. The sera of infected mice were collected at day 3, 6, 10 and 15 post-infections for RT-qPCR and serological assays (see below). Mice with clinical signs of severe disease were ethically euthanized under anaesthesia, whereas all surviving mice were euthanized at the end of the experiment. Brain and liver of euthanized mice were collected and used to perform RT-qPCR or fixed in buffered 3.7% paraformaldehyde (PFA) for post-mortem histopathological analysis.

Statistical analyses were performed by using the Graphpad Prism software (Graphpad Software Inc, La Jolla, CA).

### RT-qPCR

Brain and liver of euthanized mice were weighed and homogenized in 500  $\mu$ L of DMEM with 2 stainless steel beads (ThermoFisher) 3 times for 30 s at 30 Hz using Tissue Lyser II (Qiagen). After centrifugation at 2,000 rpm for 5 min, supernatants were collected. Viral RNA purification from serum, liver and brain samples was performed using QIAmp Viral RNA (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. One  $\mu$ g of purified RNA was treated twice with 5  $\mu$ L of RNase-free DNase (Qiagen) and subjected to a final on column purification. Part of the RNA (5  $\mu$ L) was reverse transcribed using the SuperScriptIII Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (ThermoFisher). The cDNA (3  $\mu$ L, duplicates) was subjected to a PCR reaction with the primer RVs 5' - AAA GGA ACA ATG GAC TCT GGT CA -3' , primer RVAs 5' - CAC TTC TTA CTA CCA TGT CCT CCA AT -3' and a RVP probe 6-FAM AAA GCT TTG ATA TCT CTC AGT GCC CCA A -TAMRA (Drosten *et al.* 2002). The PCR cycling conditions were 95°C for 5 min, followed by 45 cycles set up as follow: 95°C for 5 s and 57°C for 35 s. The number of viral RNA copies in each sample was determined using Gn RNA standard calibration curve. The results were expressed as number of viral RNA copy per ml of serum or g of tissue.

### RVFV serological assays (ELISA)

Specific anti-RVFV antibodies within mice sera were detected using in-house IgM and IgG ELISAs (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), as previously described (Chrun *et al.* 2019). Briefly, RVFV antigens were prepared from RVFV MP12 strain infected VeroE6 cell cultures (at a Multiplicity of Infection (MOI) of 0.01; 2 days post-infection). For IgM detection, plates (Nunc Maxisorp™, ThermoFisher) were coated with rabbit anti-mouse IgM antibody (100  $\mu$ L/well, 1:400 dilution; Sigma, SAB3701197) and incubated with 100  $\mu$ L/well of 1:100 dilution of mice sera. RVFV antigens were subsequently detected with hyperimmunised sera from hamster infected with ZH501 strain and Goat anti-Hamster IgG (H+L)-HRP (Horseradish Peroxidase) conjugated antibody. For IgG detection, plates were coated RVFV antigens, incubated with 100  $\mu$ L/well of 1:100 dilution of mice sera and subsequently with HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (whole molecule, 1:5000, Sigma, A9044). HRP enzymatic activity was revealed using TMB substrate (Life Technology). Optical density at 450 nm (OD450) was measured using a TECAN microplate reader.

### *In vitro* viral infection

HepaRG, A549 and A549Npro were seeded in 12 well format plates and infected at a MOI of 0.01 in 4% FBS DMEM medium. Two hours post-infection (p.i.) the inoculum was removed and replaced by fresh medium. The supernatant was harvested at 24, 48h p.i. Differentiated hiPSC cells were infected at a MOI of 0.1 in 4% FBS DMEM medium. The inocula were washed 2h p.i. and hiPSC maturation medium was added. The supernatant was harvested at 24, 48h p.i. and the cells fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence assay (IFA). Viral titres were measured in all the supernatants by endpoint dilution method using BSR cells and



expressed as  $\log_{10}$  50% tissue culture infective doses ( $\log_{10}$  (TCID<sub>50</sub>)/ml) determined by Spearman-Kärber method (Kärber 1931). Each experiment was conducted independently two times (neural differentiated hiPSC cells, each time with cells from two different donors) or three times (in duplicate or triplicate: HepaRG, A549 and A549Npro) using at least two different stocks of each virus.

#### Immunofluorescence microscopy

Fixed neural differentiated hiPSC were permeabilized with 1% PBS-triton X100, blocked firstly with PBS 0.1% Tween20 containing 0.4% Gelatine fish (Sigma), and secondly with PBS 0.1% Tween20 containing 2.5% Normal Goat Serum (Sigma). Cells were subsequently incubated overnight at 4° C with primary antibodies diluted 1:500. Neurons were labelled with rabbit anti-Tuj1 (Ab18207, Abcam) , astrocytes using rabbit anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein, Z0334, Dako) and viral proteins with an anti-RVSV mouse ascite (Chrun *et al.* 2018). Secondary antibodies were coupled either to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 546 (A11008 and A10036, respectively; Invitrogen). Nuclei were stained with 1µg/mL DAPI solution (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermo scientific). Images were acquired with a ZEISS LSM-800 confocal microscope at 20x magnification and analysed with ZEN 3.2 software.

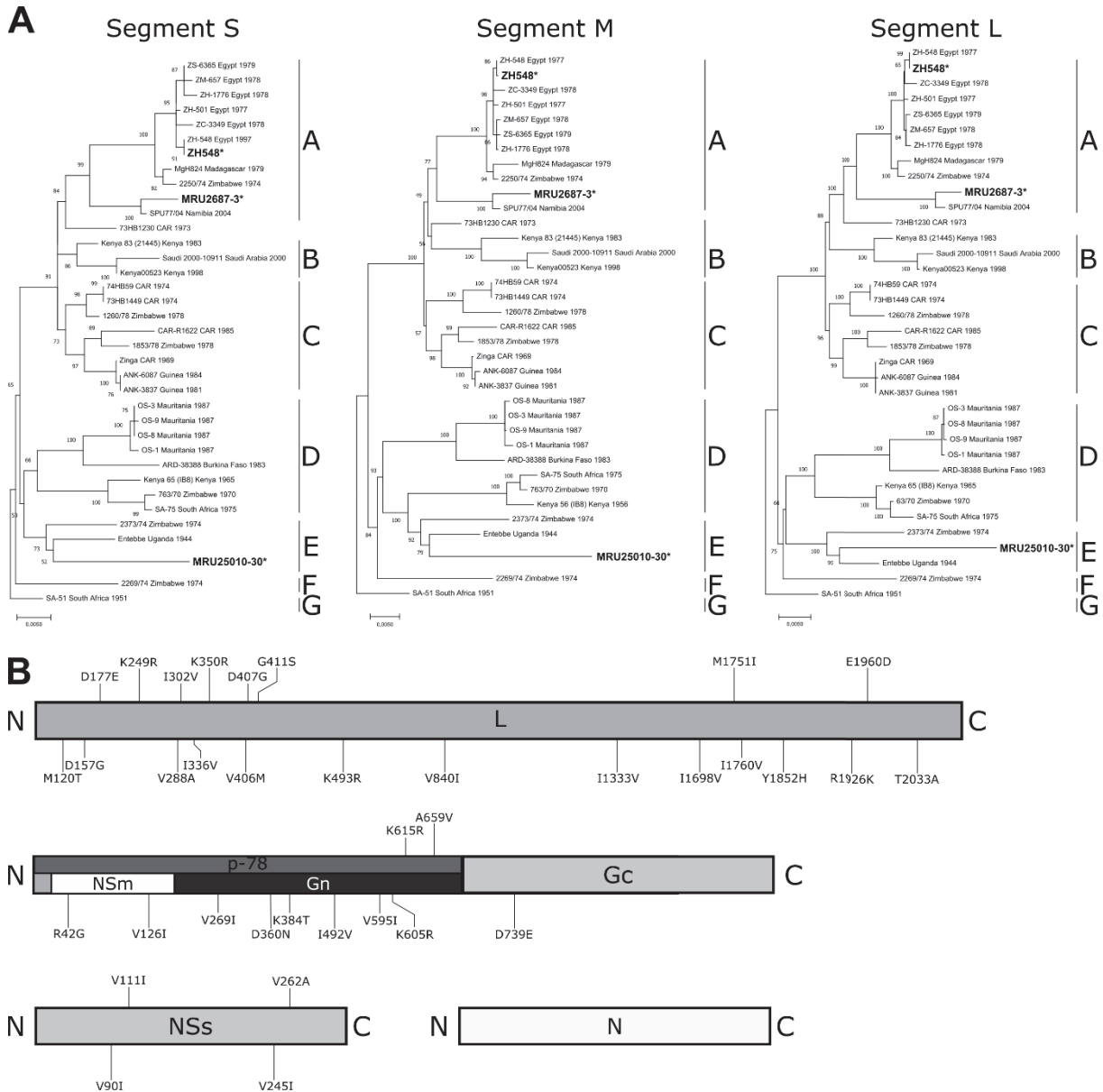
## Results

RVFV field isolates clustered in two distinct genetic lineages.

The genome of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains have been obtained by RNA-sequencing. The sequences of the 5' and 3' ends of each segment have been completed and/or checked by RACE-PCR analysis as described in Materials and Methods. We found that the percentage of identity between the nucleotide sequences of the two Mauritanian field strains was 94.6% for the L segment (6404 nts), 94.6% for the M segment (3885 nts) and 95.7% for the S segment (1691 and 1690 nts). Notably, the length of the intergenic region within the S segment of MRU25010-30 is 1 nt longer than MRU2687-3 and ZH548. This is due to the variable site at 849nt. An indel mutation in a heptamer (ACCCCC) repeat sequence is resulting in the length variation at this location. Using the phylogenetic structure based on 33 ancestral strains (Bird *et al.* 2007), phylogenetic analyses revealed that MRU25010-30 clusters with sequences of lineage E whereas MRU2687-3 belongs to lineage A, the latter also including ZH548 strain (Figure 29A). It is important to note that, for both strains, the sequences of the three segments follow the same lineage indicating that these strains are not the result of a reassortment event between two viruses from different lineages. At the amino acid level, the percentage of identity between MRU25010-30 and MRU2687-3 strains is 94.6% for L protein, 99.1% for the full-length M polyprotein (starting from AUG1), 100% for the N and 98.5% for the NSs protein. All amino acid residue substitutions between MRU25010-30 and MRU2687-3 are represented in the figure 29B and listed in Table S1 which also includes those of the ZH548 strain. We next focused on the amino acids that differ between MRU25010-30 and the other two strains MRU2687-3 and ZH548. By classifying amino acid residues based on polarity of their R-group, we did not identify drastic substitution on S segment proteins (N and NSs), whereas R42G (NSm) and K384T (Gn) mutations may be of particular interest due to the radical change in the R-chain. With this method, four residues within the L protein have also been identified (D157G, D407G, G411S and T2033A).

Deep-sequencing approach also provide us with the intra-strain genetic diversity. Indeed, nucleotide diversity can be measured using the Shannon entropy calculation for each position. We were able to identify several high frequency sites leading to the existence of a nucleotide population at a given position and extracted those inducing an amino acid residue substitution (Table 2). We observed little intra-strain genetic diversity for N, NSs and L proteins, whereas Gn protein sequence is more diverse than the other proteins and this for the three strains. For instance, the residue at position 431 is variable for both MR2687-3 and ZH548 strains with either an asparagine or, respectively, a lysine (8%) or serine (9%). Additionally, the leucine residues at the positions 232 of Gn (83%) and 747 of Gc (88%) in the ZH548 strain exist as a population, the amino acid less frequently found (232Q and 747I) being identical to the residues found in the two other strains. Interestingly, the amino acid residue at position 384 of MRU25010-30 is highly variable and could be a lysine (49%), a threonine (43%, corresponding to the consensus residue for MRU2687-3 and ZH548 strains) or an arginine (7%). Finally, data obtained from both RNA-sequencing and

RACE-PCR approaches also allow us to identify genetic diversity within the 5'UTR of the anti-genomic M segment for both MRU2687-3 and ZH548 strains (Figure S1). Indeed, the nucleotide at the position 10 is either an uracil (U, preponderant in MRU2687-3 for both RNA-sequencing and RACE PCR data) or a cytosine (C, preponderant in ZH548 for RNA-sequencing but under-represented in RACE-PCR, figure S1), the latter being constitutively found in MRU25010-30 strain.



**Figure 29 : Phylogenetic trees and protein sequences analysis of MRU25010-30 and MRU2687-3 strains.** (A) Phylogenetic analysis of the S, M and L segments based on the classification of Bird et al (Bird et al. 2007). The evolutionary history was inferred using the maximum likelihood (ML) method and general time reversible model (GTR) with 500 replicate bootstrap. MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 are in bold text and indicated by an asterisk. Genetic lineages (A-G) initially proposed by Bird and colleagues are represented for each segment. (B) Schematic representation of the amino acid residue substitutions between the consensus sequences of MRU25010-30 and MRU2687-3. L protein (top panel), full length polyprotein of segment M (middle panel) and, NSs and N proteins (bottom panel) are presented. Specific N-terminal region of p78 is shown in dark grey,

*NSm in white, Gn in black and Gc in light grey. Position and amino acid residues different between MRU25010-30 (left) and MRU2687-3 (right) strains are indicated.*

**Table 1: Intra-strain genetic diversity of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains.** Amino acid residue substitutions are classified by strains, viral segments and related proteins. Note that the numbering of Gn protein starts from AUG1 used to translate p78. The percentages have been calculated using read counts at the given position and rounded to the nearest unit.

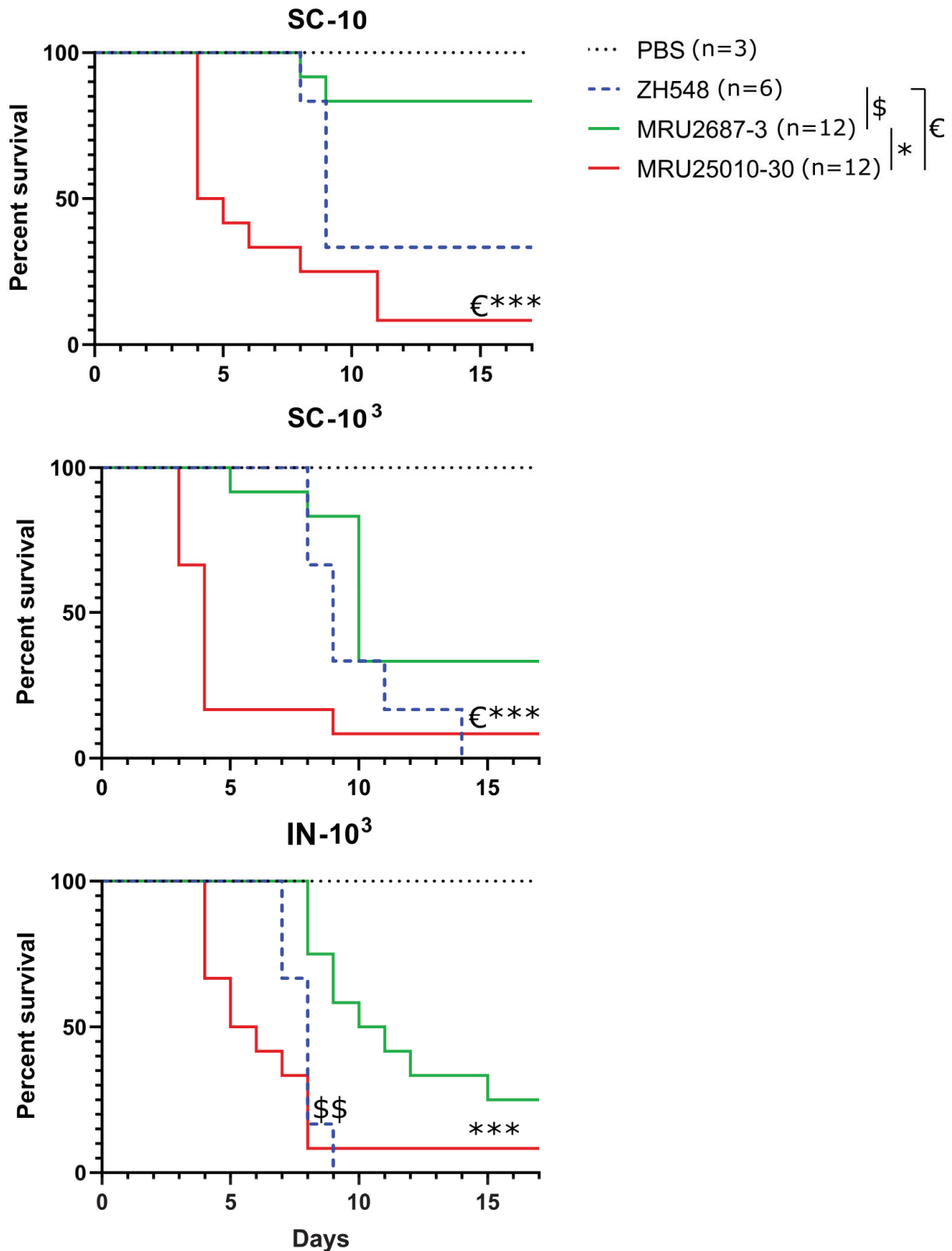
Strains	Segment s	Proteins	AA Positions	Consensus AA (%)	Minors AA (%)
MRU25010-30	S	N	216	E (85)	G (15)
	M	Gn	384	K (49)	T (43) R (7)
MRU2687-3	S	NSs	112	S (90)	P (10)
	M	Gn	376	E (82)	G (18)
	M	Gn	430	A (79)	T (21)
	M	Gn	431	N (90)	K (8)
	M	Gn	642	N (92)	S (8)
	L	L	301	A (92)	E (7)
ZH548	M	Gn	232	L (83)	Q (17)
	M	Gn	236	G (93)	R (7)
	M	Gn	431	N (91)	S (9)
	M	Gc	747	L (88)	I (12)

RVFV MRU25010-30 is more virulent than MRU2687-3 in BALB/C mice.

Since we found out that the genomic sequences of two RVFV strains circulating in Mauritania in 2010 and 2013 clustered into two different genetic lineages, we next investigate their virulence in a mouse model. To this end, we experimentally infected BALB/C female mice with MRU25010-30 and MRU2687-3 strains as well as ZH548, being a laboratory virulent reference strain (Borrego *et al.* 2021; do Valle *et al.* 2010). Viruses were inoculated by two different routes, either subcutaneously (SC), in order to mimic vector transmission, or intranasally (IN) to simulate the direct exposure to contaminated fluids. We used two different infectious doses for SC groups (10 and 10<sup>3</sup> PFU) and only the highest one for IN groups (10<sup>3</sup> PFU).

The Kaplan-Meier curves show that MRU25010-30 strain is significantly more virulent than MRU2687-3 in all the three conditions tested (SC-10, p<0,001; SC-10<sup>3</sup>, p<0,001; IN-10<sup>3</sup>, p<0,001) (Figure 30). Remarkably, the onset of mortality of MRU25010-30 infected mice occurred much earlier (D3/4 p.i.) compared to those infected with MRU2687-3 (approximately D8 p.i.). Only one mouse infected with MRU2687-3 (SC-10<sup>3</sup> group) died prematurely at D5 p.i. Overall, the median survival of mice infected with MRU25010-30 is 4-5 days while those infected with MRU-2687 is 10 days. Moreover, inoculation route did not modulate the virulence of MRU2687-3 strain but

we observed an effect of the dose in SC groups ( $p=0,0408$ ), as we did in mice infected with MRU25010-30 ( $p=0,0365$ ). However, MRU25010-30 strain is also more virulent in SC- $10^3$  condition compared to IN- $10^3$  ( $p=0,0220$ ), indicating that intranasal infection is delaying pathogenesis induced by this strain (Figure 30). Although ZH548 ( $n=6$ ) induced higher mortality at the end of the experiments, it behaved very similarly to MRU2687-3 when inoculated subcutaneously, with the onset of death in infected mice at D9 p.i. and regardless of the initial dose (SC-10 and SC- $10^3$ ). Surprisingly, unlike the other two strains, ZH548 was more virulent by intranasal inoculation than by subcutaneous injection ( $p=0.0411$ ; median survival=8 days) and was statistically similar to MRU25010-30 in this condition ( $p=0.0853$ ). Due to the sudden death induced by MRU25010 strain (most of the mice of the SC groups), we did not observe an impact of the infection on body weight (Figure S2). After infection with MRU2687-3 and ZH548, we observed a reduction in body weight prior to death of the animals similar to mice infected intranasally with MRU2010-30. Due to the rapid death of mice by MRU25010 in SC, we did not observe in the majority of cases an impact on body weight except when mice succumbed later ( $>5$  days p.i.) (Figure S2). Overall, our data show that the pathogenesis induced by MRU25010-30 is different from MRU2687-3 and ZH548; MRU25010-30 being a hypervirulent strain compared to the other two.

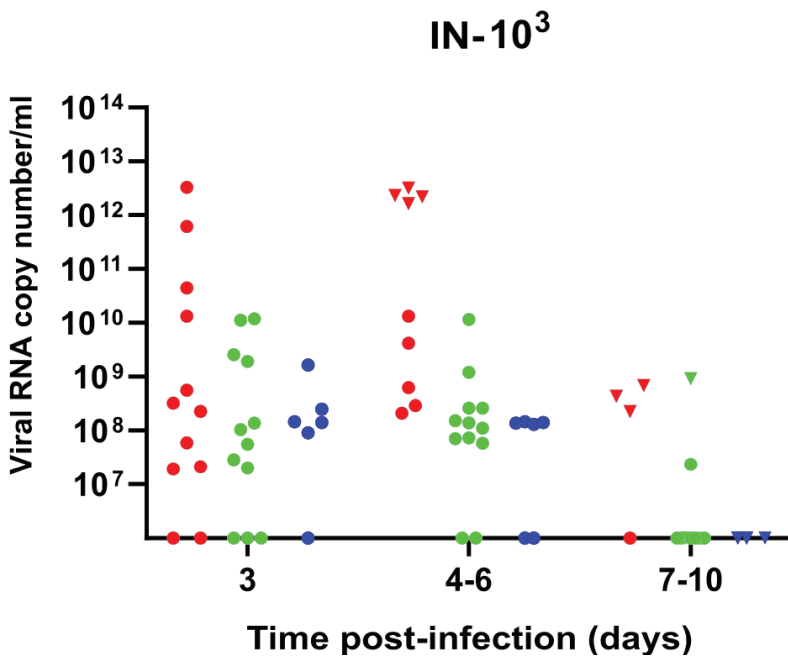
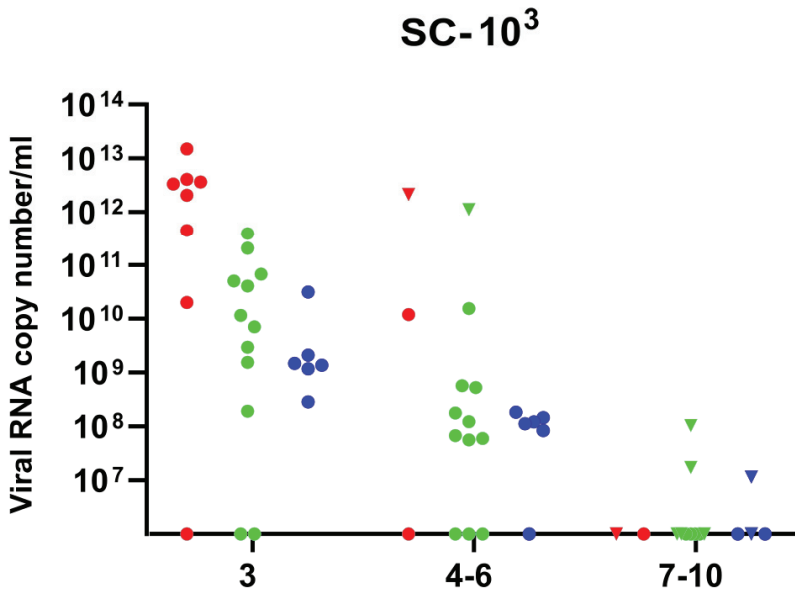
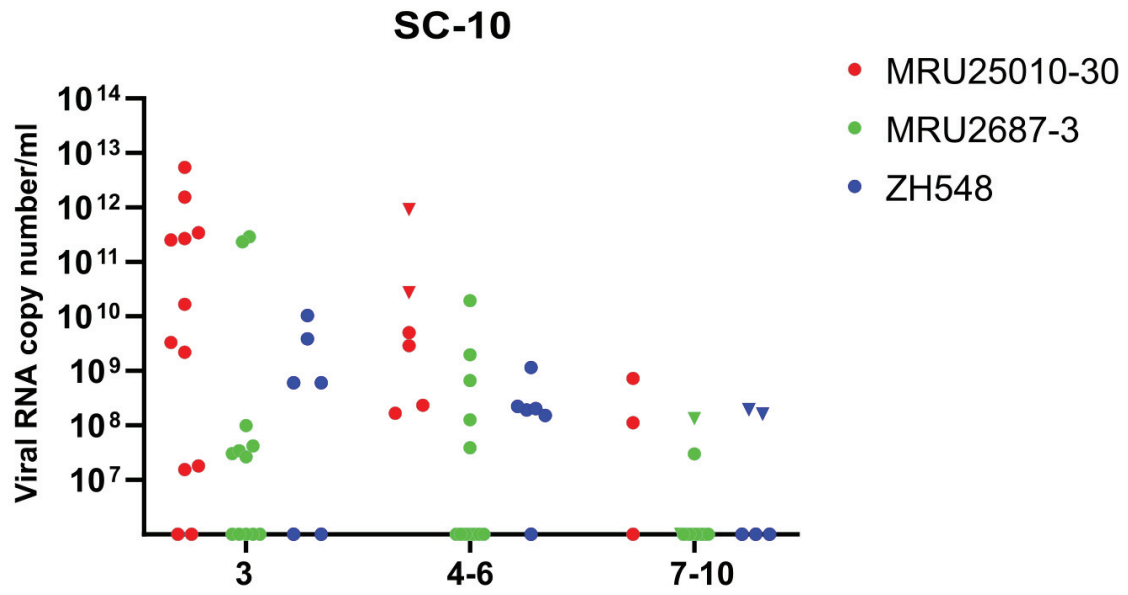


**Figure 30 : Kaplan-Meier survival curves of BALB/C mice infected by MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains.** Six-eight weeks old female BALB/C mice have been infected intranasally (IN) or subcutaneously (SC) with 10PFU ( $10^1$ ) or  $10^3$  PFU ( $10^3$ ) of the indicated RVFV strains. Statistical analysis was performed using Gehan-Breslow-Wilcoxon test: MRU25010-30 vs MRU2687 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) - MRU25010-30 vs ZH548 (€  $p < 0,05$ ) - MRU2687-3 vs ZH548 (\$\$  $p < 0,01$ )

Next, we aimed to assess the humoral response in RVFV infected mice (Figure S3). As expected, mice from all groups were IgM positive at D6 p.i. and IgG positive at D10 p.i. Moreover, if not killed by the virus, all the mice seroconverted by the end of the experiment, except one mouse infected by MRU2687 (SC-10<sup>3</sup> group). Overall, these data suggest that RVFV, independently of the strain considered, does not prevent the initiation of the humoral immune response in BALB/c mice but this occurs too late to effectively protect the animals.

#### Early death induced by MRU25010-30 strain is associated with high viremia

RVFV RNA was detectable in most of the mice sera at 3 days p.i. whatever the route of inoculation or the strain (Figure 31). Overall, the numbers of viral RNA copies measured for MRU25010-30 infected mice groups were the highest and reached values of 10<sup>12</sup>-10<sup>13</sup> copies per ml of serum, especially in SC-10<sup>3</sup> group meaning the animal death induced by MRU25010-30 is usually associated with a strong viremia. Concomitantly, a lower dose or an intranasal infection tends to delay the viremia peak and the onset of death (figure 30). Indeed, animals from SC-10 and IN-10<sup>3</sup> groups that succumbed later compared to other groups (i.e. after D6 p.i.) display a reduced viremia (figure 31). Overall, the viremia induced by ZH548 were comparable to that of MRU2687 strain, although slightly lower in the SC-10<sup>3</sup> group at D3 p.i. We did not observe marked differences in ZH548 viral loads between SC-10<sup>3</sup> and IN-10<sup>3</sup> groups, although the route of infection modulated the virulence of this strain (figures 30 and 31). Interestingly, although high viral RNA copy numbers have been observed in the sera of mice infected by MRU2687-3, the vast majority of the animals killed by the infection show a reduced or no viremia in the sera at the time of death. Overall, these data show that early death induced by MRU25010-30 correlates with high viral load. Viremia observed in animals dying later (>D6 p.i.) is generally lower or undetectable.

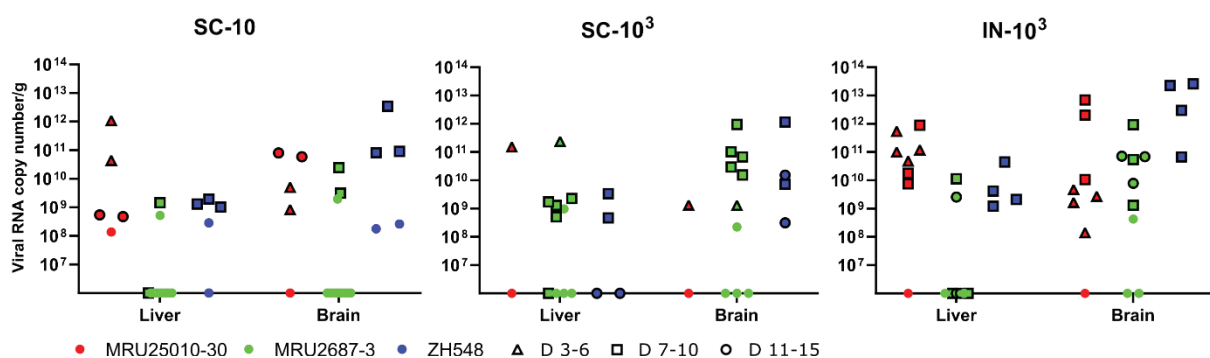




**Figure 31 : RVFV viremia kinetics in BALB/c mice.** 6-8 weeks old female BALB/c mice have been infected intranasally (IN) or subcutaneously (SC) with 10PFU (10) or 10<sup>3</sup>PFU (10<sup>3</sup>) of the indicated RVFV strain. Levels of viral RNA have been measured in sera of infected mice by RT-qPCR targeting segment M. Values are expressed in viral RNA copy number per ml of serum. Sera have been collected at days 3, 6 and 10 (circles) as well as in euthanised mice (inverted triangles). MRU25010-30 (n=12) is indicated in red, MRU2687-3 (n=12) in green and ZH548 (n=6) in blue.

### RVFV organ tropism and dissection of the early stages of infection in BALB/c mice

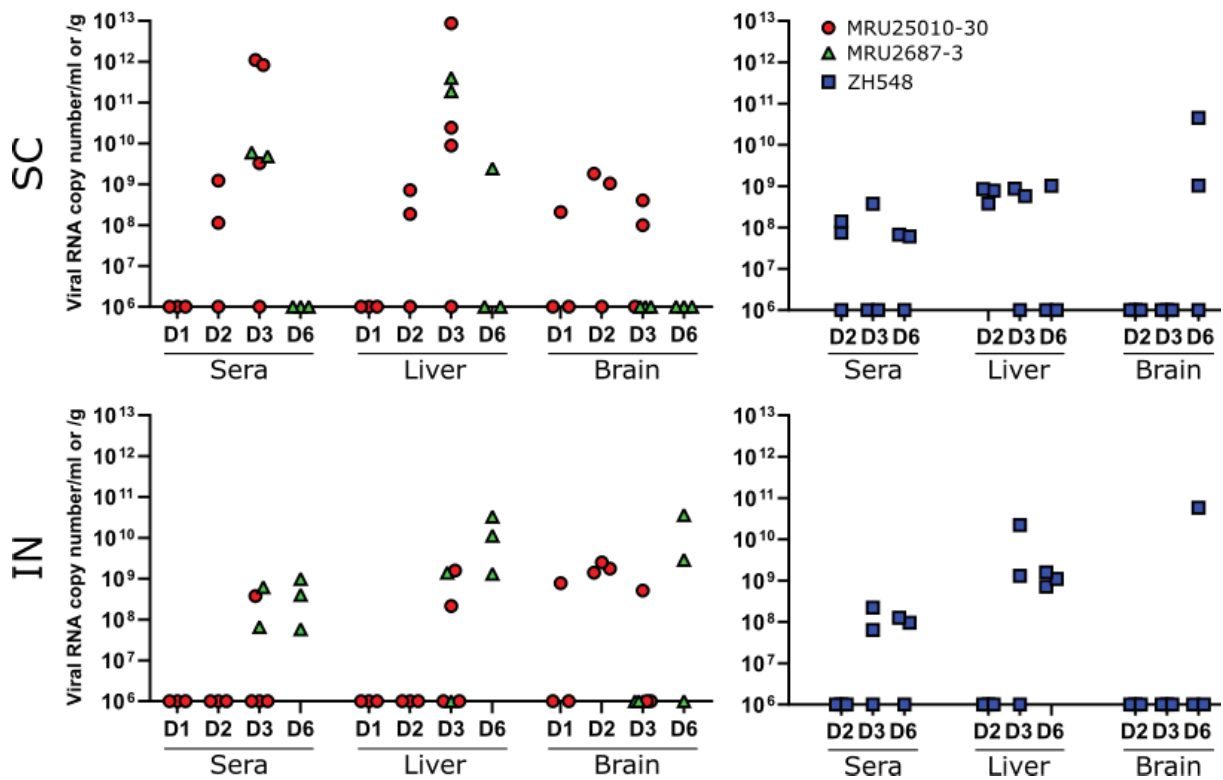
In order to further characterise RVFV dissemination to organs, we assessed the level of RVFV RNAs in the liver and brain of the mice that have been euthanized during the course of the experiment (Figure 32). First of all, we only had one animal for MRU25010-30 SC-10<sup>3</sup> group due to sudden death of most of the mice of this group. In this mouse (D4 p.i.), the virus has been detected both in the liver ( $\approx 10^{11}$  vRNA copies/g) and, to a lesser extent, in the brain ( $\approx 10^9$  vRNA copies/g). The same observation has been made for mice from SC-10 ( $\approx 10^{10}$ - $10^{12}$  versus  $\approx 10^9$  vRNA copies/g, D4 and D6 pi) and IN-10<sup>3</sup> ( $\approx 10^{11}$ - $10^{12}$  versus  $\approx 10^8$ - $10^9$  vRNA copies/g, D4-D5 p.i.) as well as in the only mouse from MRU2687-3 SC-10<sup>3</sup> group ( $\approx 10^{11}$  versus  $\approx 10^9$  vRNA copies/g, D5 p.i.) (triangles in Figure 32). However, we show that at later times (D7-D15, squares and dots in Figure 32), although MRU25010-30 is detected in both organs, the viral load is higher in the brain than in the liver, such as what we observed with of MRU2687-3 and ZH548 strains, independently of the route of inoculation. Moreover, all the euthanized mice (n=6) from MRU2687-3 IN-10<sup>3</sup> group as well as one mouse from both MRU2687-3 SC-10 and SC-10<sup>3</sup> groups, were positive for RVFV in the brain but negative in the liver. Although, MRU2687-3 and ZH548 strains are very comparable, ZH548 has been detected both in the liver and in the brain of all the mice euthanized from D7 to D10 (blue squares, Figure 32). Altogether, these data suggest that, at earlier time point (D3-D6), MRU25010-30 virulence is mainly linked to high viral load in the liver, even though the virus has been also detected early in the brain of the infected animal and is able to replicate sustainably in this organ. In contrary, MRU2687-3 and ZH548 pathogenesis seems to be mostly correlated with an active viral replication within the brain of the BALB/c mice.



**Figure 32 : Levels of RVFV RNA in the liver and brain of BALB/c infected mice.** During the course of the experiment, suffering animals have been euthanised due to ethical reason. Liver and brain have been collected and levels of viral RNA measured. Values are expressed as viral RNA copy number per g of liver or brain. Triangles represent animal euthanised between D3 and D6 p.i. squares between D7 and D10 p.i. and dots between D11 and D15 p.i. Surviving mice at D15 are represented with encircled dots.

Next, we refined the viral replication kinetics and organ tropism at an early time point after inoculation of the three RVFV strains studied. To do so, we infected BALB/c mice intranasally (IN-10<sup>3</sup>) or subcutaneously (SC-10<sup>3</sup>) and collected serum, liver, and brain at D1, D2, and D3 p.i. (MRU25010-30), at D3 and D6 p.i. (MRU2687-3), and at D2, D3, and D6 p.i. (ZH548). After subcutaneous infection, MRU25010-30 was detected in the sera and the liver of 2 out of 3 mice at D2 (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> vRNA copies/ml and 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> vRNA copies/g) and all the mice at D3 ( $\approx$ 10<sup>9</sup> and 10<sup>12</sup> vRNA copies/ml and between 10<sup>10</sup> to 10<sup>13</sup> vRNA copies/g) (Figure 33). Interestingly, MRU25010-30 has been also found in the brain of one mouse at D1 p.i. ( $\approx$ 10<sup>8</sup> vRNA copies/g) and 2/3 mice at D2 and D3 pi ( $\approx$ 10<sup>9</sup> and 10<sup>8</sup> vRNA copies/g, respectively). These data confirm that MRU25010-30 is replicating very early after infection in both the liver and the brain of infected mice, and that the viremia in the sera and the viral load in the liver is rapidly increasing to reach very high viral titres at D3 p.i. Moreover, intranasal infection is delaying viral load within the liver as well as the viremia with no mouse positive before D3 p.i. when RVFV RNA has been detected in the liver of two mice (10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> vRNA copies/g) and only one serum ( $\approx$ 10<sup>8</sup> vRNA copies/ml) (Figure 33). Notably, the virus was detected in the brain of one mouse at D1, 3 mice at D2 and 1 mouse at D3 at levels comparable to that of SC infection ( $\approx$ 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> vRNA copies/g), strengthening that this organ is precociously targeted by this strain and that it is not modulated by the inoculation route.

For strain MRU2687-3, we also analysed earlier times (D3 and D6 p.i.) to better understand the early stages. We show that 2/3 mice from SC-10<sup>3</sup> group were RVFV positive in the serum (10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> vRNA copies/ml) and liver ( $\approx$ 10<sup>11</sup> vRNA copies/g) at D3 p.i. (Figure 33). Unfortunately, one mouse has been found dead at D6 pi, withal we detected RVFV RNA only in 1/2 mice in the liver ( $\approx$ 10<sup>9</sup> vRNA copies/g) when the two sera were negative. By subcutaneous route, we did not find any mice with RVFV-positive brain, whereas 2/3 mice were positive when infected intranasally ( $\approx$ 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> vRNA cop.i.es/g, D6 p.i.). Furthermore, MRU2687-3 is detected at D3 p.i. in 2 out of 3 sera ( $\approx$ 10<sup>8</sup> vRNA cop.i.es/ml) and 1 out of 3 livers ( $\approx$ 10<sup>9</sup> vRNA cop.i.es/g), although at lower level of viral RNA compared to that of SC-10<sup>3</sup> group. However, all the mice were positive (sera and liver) at D6 p.i., suggesting again that the intranasal infection may delay the viral replication in the liver even if we did not observe an effect of the inoculation route on the virulence of this strain (Figure 30). Altogether, these data confirm that MRU2687-3 strain is able to replicate efficiently in the liver of infected mice and is detected into the brain only at a later time point (> D6 p.i.) compared to MRU25010-30. The same is globally observed in ZH548 infected mice, although the number of vRNA copies is substantially lower in the liver and the sera at D3 p.i. for SC-10<sup>3</sup> group, compared to both field strains (Figure 33).



**Figure 33 : Levels of RVFV RNA in the serum, liver and brain of BALB/c mice at early stages of infection.** 6-8 weeks old female BALB/c mice have been infected intranasally (IN) or subcutaneously (SC) with  $10^3$  PFU of MRU25010-30 (red), MRU2687-3 (green) or ZH548 (blue). Levels of viral RNA have been measured by RT-qPCR targeting segment M and values are expressed as viral RNA copy number per ml (serum) or per g (liver and brain). Sera have been collected at days 1, 2 and 3 (MRU25010-30, n=3), days 3 and 6 (MRU2687-3, n=3 but in SC- $10^3$  group where one mouse died at D6 p.i.), and days 2, 3 and 6 (ZH548, n=3).

### MRU25010-30 replicates more efficiently than MRU2687-3 in various *in vitro* cell culture models

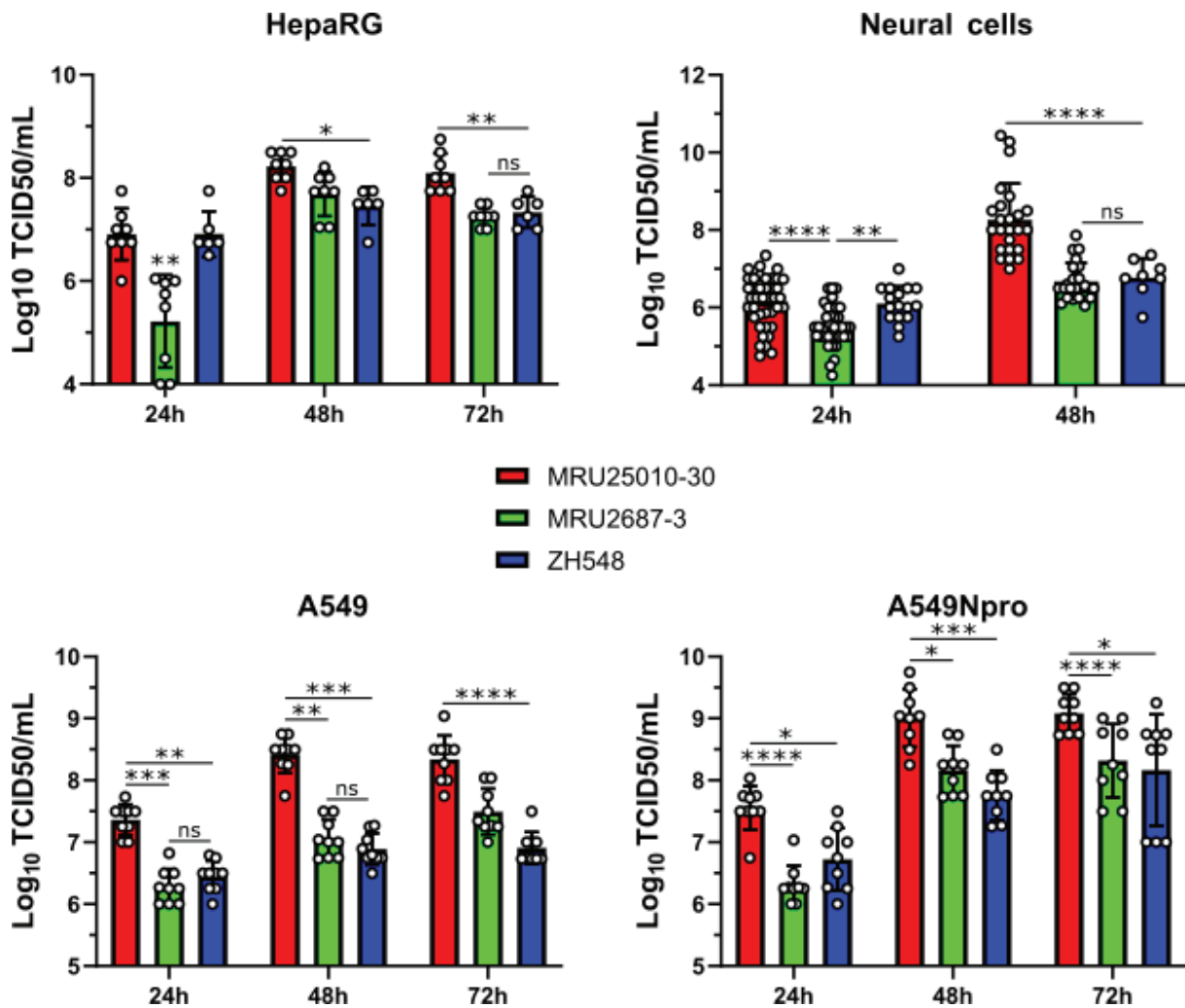
The *in vivo* data presented above showed that the liver is a primary target of the virus and that MRU25010-30 strain replicates more efficiently in this organ than MRU2687-3 and ZH548 strains. To further characterise the growth properties of these three strains in hepatic cells, we infected human HepaRG cells at MOI of 0.01. We observed that cells infected by MRU25010-30 produced, over the time, significantly higher number of infectious particles than cells infected by MRU2687-3, with a difference of viral titres of approximately 2 and 0.5  $\log_{10}$ (TCID<sub>50</sub>/ml) at 24 and 48h p.i., respectively (Figure 34). Notably, ZH548 viral titre is comparable to MRU25010-30 at 24h p.i. but 5.6 times lower at 48h p.i. as for MRU2687-3. Altogether, these results are consistent with the data obtained *in vivo* in mice model and confirm a greater replication capability of MRU25010-30 in hepatic cells compared to the two other strains.

In the BALB/C mouse model, we have shown that the MRU25010-30 is detected earlier in the brain of infected animals compared to the other two strains. However, it is not clear whether there is a difference in growth properties between the three strains in this organ. To answer this question, we used human induced pluripotent cells (hiPSC) from two different donors and subsequently differentiated into “neural

cells”, essentially a multiculture composed mainly of neurons, astrocytes and oligodendrocytes (Ryan *et al.* 2020). Each well of multiculture has been infected with  $2 \times 10^4$  PFU (approximately a MOI of 0.1) and viral titres measured at 24 and 48h p.i. Since there was no “donor” effect on our data (Kruskal-Wallis test), we pooled the two sets of viral titre measures for further analysis (Figure 34). At 24h p.i, MRU25010-30 and ZH548 generate higher infectious titre than MRU2687-3. Overall, virus titres increased between 24 and 48h p.i, indicating that all RVFV strains tested are able to replicate and disseminate in these cells. However, at 48h p.i, MRU25010-30 strain produces average titers approximately  $1.5 \log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  higher than those observed for MRU2687-3 and ZH548 (Figure 34).

We were next interested to determine the cell tropism of these RVFV strains in this cellular model by immunofluorescent assay and confocal microscopy analysis. This approach revealed that both neurons (Figure S4A) and astrocytes (Figure S4B) are infected by the three virus strains. Taken together, these results highlight that MRU25010-30 is replicating at higher level than MRU2687-3 and ZH548 in these human neural cells, and that it is not due to a difference in the cell tropism of these viruses for neurons or astrocytes.

In mammals, the interferon system is often considered as the first line of defence against viral infection and it has already been shown that it is modulating the pathogenesis induced by RVFV in both the liver and the brain of infected animals (Sen 2001; Bouloy *et al.* 2001; Hum *et al.* 2021). In order to assess the impact of the interferon response on our RVFV strains replication, we infected at a MOI of 0.01 A549 cells (known to produce and respond to type 1 interferon, IFN-1) and A549Npro cells (expressing Bovine viral diarrhoea virus N-terminal protease that is promoting IRF3 degradation and therefore inhibiting IFN production). We next measured the viral titres at 24 and 48h p.i. First, we showed that MRU25010-30 replicates in both cell lines at a higher level than the two other strains, strengthening its upper growth capabilities (Figure 34). However, although viral titres are increasing slightly more for MRU2687-3 and ZH548 in A549NPro cells compared to that of A549 cells at 48h p.i. (approximately  $1 \log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  versus half a log for MRU25010-30), we did not observe statistically significant difference between the ratio of the mean titers between cells type for both strains (data not shown). Those results suggest that all RVFV strains tested in this study counteract interferon response in a similar manner.



**Figure 34 :** *In vitro* growth properties of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains. HepaRG A549 and A549Npro cells have been infected at MOI 0.01, while hiPSC differentiated into neural cells were infected with  $2 \times 10^4$  PFU (approximately a MOI of 0.1). Supernatants were collected at 24 and 48h p.i. and subsequently analysed by TCID50 method. Titres are expressed as  $\log_{10}$  (TCID50/ml of supernatant). In conventional cell lines, this experiment was repeated three times independently, each time either in duplicate or in triplicate. Experiment in hiPSC differentiated into neural cells has been repeated two times independently (MRU25010-30 and MRU2687-3) or performed once (ZH548) using hiPSC obtained from two donors (MRU25010-30 and MRU2687-3:  $n=40$  at 24h p.i. and  $n=24$  at 48h p.i.; ZH548:  $n=16$  at 24h p.i. and  $n=8$  at 48h p.i.). The error bars represent standard deviations around the mean value. Kruskal-Wallis statistical analyses were performed, and significance is presented as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) and  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*) ns (non-significant).

## Discussion

The first RVF outbreak in West Africa was recorded in 1987 and, since then, the virus has been particularly active in this region, causing multiple epidemics of varying magnitude and severity (Barry *et al.* 2022a; El Mamy *et al.* 2014; Nabeth *et al.* 2001; Faye *et al.* 2007; Bob *et al.* 2017). In 2010, 63 human cases have been reported in the northern part of Mauritania, leading to the death of 13 persons (El Mamy *et al.* 2011). Notably, all human cases were involved in animal husbandry (El Mamy *et al.* 2011; Faye *et al.* 2014). This episode was exceptional in regards of the clinical signs and high mortality rate observed among dromedary camel population. The 2013-2014 outbreaks in Senegal and Mauritania occurred in an unusual wide geographic area,

reaching urban centers such as Dakar (Sow *et al.* 2016; 2014). It is well-established that multiple RVFV introductions took place in West Africa and that several RVFV lineages are circulating in this area (Soumaré *et al.* 2012). In this study, we aimed to investigate the biological properties of two RVFV strains isolated in Mauritania in order to assess the impact of the viral genetic diversity on RVF pathogenesis and replication capacity.

We found that BALB/c mice infected with MRU25010-30 strain succumbed earlier than the one challenged with MRU2687-3, independently of the inoculation route (SC-10<sup>3</sup> and IN-10<sup>3</sup>). MRU25010-30 increased virulence is correlated with a higher viremia and viral load in the liver of the animals. Comparatively, MRU2687-3 and ZH548 pathogenesis is mainly linked with an active viral replication in the brain at later time point post-infection (Figure 35). These results for the MRU2687-3 and ZH548 are in line with disease features previously described in this mouse model, i.e. an acute-onset liver disease and a delayed-onset encephalitis (Smith *et al.* 2010). Moreover, it has been previously shown that RVFV infectious dose does not modulate viral load in organs at the time of death (Barry *et al.* 2022; Cartwright *et al.* 2022). In our model, we showed that MRU25010-30 pathogenesis was only slightly delayed by using a lower dose or via intranasal inoculation; the later slowing down the infection of the liver. In contrast, the inoculation route had no effect on the dynamics of pathogenesis induced by strain MRU2687-3, in line with the delayed-onset neurological form of the disease.

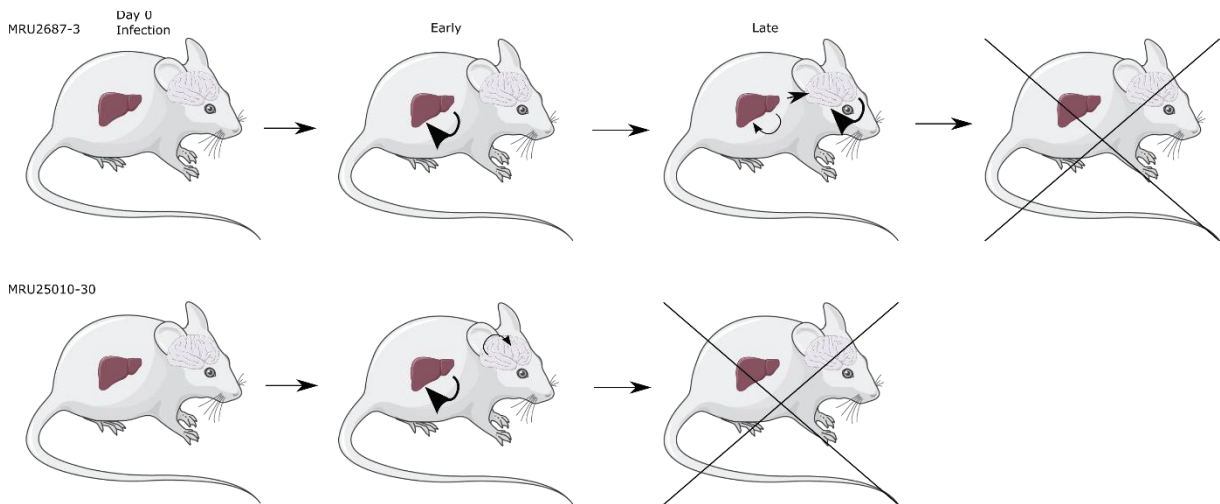
Altogether, our data strongly suggest that MRU25010-30 has an increased potential to induce deadly liver damage compared to MRU2687-3 strain. These results are supported by the strong replication capacity of MRU25010-30 strain *in vitro* in HepaRG cells. Interestingly, we showed that the same is true in a human neural cells model. Since we also detected MRU25010-30 in the brain of infected mice as soon as 1-day p.i., it is thus possible that viral replication in this organ participates to the pathogenesis induced by this strain. Our data do not allow us to determine the infection route(s) of central nervous system (CNS) by MRU25010-30. RVFV targets the olfactory neurons lining the nasal tract, and mice exposed to aerosols have been shown to develop a much earlier and severe neuropathology than subcutaneously injected animals (Reed *et al.* 2013). In our study, we did not observe drastic differences onset of detection in the CNS between IN and SC conditions, it seems unlikely that the olfactory tract is the main route of entry in the CNS for SC infection, as previously shown in BALB/c mice or Lewis rats infected by aerosol inhalation (Boyles *et al.* 2021; Reed *et al.* 2013; Dodd *et al.* 2014). An hypothesis could be an early infection of macrophage pial or dendritic cells near the meningeal brain barrier, as proposed for West-Nile virus (WNV) (Bai *et al.* 2010; Rua *et al.* 2019; Cain *et al.* 2019; Kang et McGavern 2008). Indeed, RVFV is known to produce replicative particles in those cells types (Rua et McGavern 2018; McElroy et Nichol 2012; Grolla *et al.* 2012; Gomet *et al.* 2011). Interestingly, it has been reported that an early influx of infected neutrophils, leukocytes or microglia allows RVFV to enter the CNS without disrupting the blood-brain barrier (BBB), although detection of the virus in this organ is a phenomenon that usually occurs at a later time (Dodd *et al.* 2014;

Albe *et al.* 2019; Walters *et al.* 2019). MRU25010-30 strain could infect earlier those cell types and therefore cross the BBB quickly after infection.

Complete genome sequencing and phylogenetic analysis showed that MRU25010-30 belongs to lineage E containing Entebbe strain and a strain isolated in Zimbabwe (2973/74 strain), whereas MRU2687-3 strain clusters in lineage A regrouping mainly Egyptian isolates and Namibia, including the ZH548 strain used as a reference strain in this study (Bird *et al.* 2007). Interestingly, Entebbe strain (E) inoculated intraperitoneally to CD-1 mice was more virulent than ZH501 strain (A) (Ikegami *et al.* 2017b), while the lethal dose 50 (LD50) of Entebbe was higher than of ZH501 in WF rats (Anderson et Peters 1988). By comparing protein sequences obtained in this study, we identified several amino acid residue substitutions between MRU25010-30 and MRU2687-3, in particular within NSm (R42G), Gn (K384T), and L (D157G; D407G; G411S; T2033A), that could contribute to the differences observed *in vivo* and *in vitro*. The role of NSm is still poorly understood but it has been shown to be dispensable *in vitro* for viral replication and a mutant virus unable to express NSm/NSm' is greatly attenuated in C57BL/6 mice (Bird *et al.* 2007; Kreher *et al.* 2014; Won *et al.* 2006; Gerrard *et al.* 2007). The NSm is known to have an anti-apoptotic effect due to a located in its C terminal domain (Terasaki, Won, et Makino 2013). However, R42G mutation is in the N terminal region of NSm and, therefore, it should not impact its anti-apoptotic function. Gn protein, together with Gc, is involved in the viral entry processes as well as viral particle morphogenesis and release (Léger *et al.* 2016a; Lozach *et al.* 2011b; de Boer *et al.* 2012b; Ganaie *et al.* 2021b; Boer *et al.* 2012; Schreur et Kortekaas 2016b). K384T is located in the domain B at the surface of Gn and could therefore interfere with Gn functions (Halldorsson *et al.* 2018a; Wu *et al.* 2017b). Both mutations (R42G and K384T) are also part of p78 that has been shown to be essential for RVFV dissemination in mosquitoes. The lack of p78 expression did not modulate RVFV virulence in mice (Kreher *et al.* 2014); however, a recent study showed that the quantity of p78 produced by RVFV impacts virus replication rates in human macrophages as well as its virulence in infected mice (Terasaki *et al.* 2021) suggesting that further studies should be primarily focused on NSm, Gn and p78 proteins functions (Kreher *et al.* 2014).

L protein is the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) involved in the transcription and replication processes as well as cap-snatching mechanism (Olschewski *et al.* 2020; Wang *et al.* 2022). D157G is located in the endonuclease domain while D407G and G411S are part of the Arch domain, within PA-C like domain that are the core structural domain (Chen *et al.* 2021). Finally, T2033A is located at the C terminal part of the RdRp within the PB-2 like domain which is involved in nucleotide binding (Chen *et al.* 2021). Surprisingly, we did not identify amino acid residue substitutions drastically changing the charge of the R-group in NSs protein, the main RVFV virulence factor (Billecocq *et al.* 2004; Muller *et al.* 1995b; Le May *et al.* 2004; Ikegami *et al.* 2009a). Notably, V262A mutation is situated at the X position of the  $\Omega$ XaV motif, known to be required for NSs nuclear filament formation and function (Cyr *et al.* 2015). Although this amino acid may be involved in the difference observed between the two strains, our results suggest that the increased growth

properties of MRU25010-30 in A549 cells is not linked to IFN pathway that is known to be inhibited by NSs.



**Figure 35** : Model of viral dissemination and replication of MRU25010-30 and MRU2687-3 strains in the liver and the brain of BALB/c infected mice

In this study, we decided to characterize RVFV strains minimally passaged after their isolation in the field and without any plaque purification step in order to keep intra-strain genetic diversity. Indeed, it is known that genetic diversity in viral inoculate is affecting virulence for WNV (Vignuzzi *et al.* 2006; Sanz-Ramos *et al.* 2008; Bifani *et al.* 2021). It has also been shown that viral subpopulations are modulating virulence in CD-1infected mice (Ikegami *et al.* 2017b; Morrill *et al.* 2010b). Deep sequencing analysis allowed us to assess the genetic diversity of the inocula used to infect BALB/c mice. Thus, we identified viral subpopulation in the three studied strains. Interestingly, we found only two variable positions in MRU25010-30 strains compared to six and four in MRU2687-3 and ZH548, respectively. Notably, the vast majority of the diversity has been found in Gn protein sequence (8 out of 12, the others being located in N, NSs, L and Gc). Interestingly, MRU25010-30 exists as a population at the position 384 (K/T) that has not been found variable with MRU2687-3 and ZH548 strains (T). Finally, deep-sequencing analysis combined with RACE-PCR approach allowed us to unveil a subpopulation within the MRU2687-3 and ZH548 strains that differs in the 5'UTR of segment M (antigenome) at position 10 presenting an uracil or a cytosine. The uracil 10 leads to the presence of an additional initiation codon located upstream of AUG1 and that has been already described for MP-12 vaccine strain (K. Takehara *et al.* 1989a; Takehara *et al.* 1990).

Our study has shown striking differences in virulence between two field RVFV strains and one of these strains MRU25010-30 can be described as hypervirulent. Thanks to the complete genomic sequences of MRU25010-30 and MRU2687-3 that we have generated, it will be now possible to develop specific reverse genetics systems for these two strains to decipher the impact of quasi-species as well as amino acid substitutions on the RVFV virulence and replication. In this line, our comparative study highlights the importance of strengthening such approaches to further characterize RVFV pathogenicity, viral molecular determinants associated with its virulence or vector transmission. It implies to collect more viral isolates and generate



full-genome sequencing when possible. This effort would greatly help to implement control strategies adapted to the threat posed by emerging RVFV strains in a given area.

## Conclusion

The strains that circulated in Mauritania in 2010 and 2013 showed strong differences in virulence in the BALB/c mouse model but also in term of *in vitro* growth in various cell models. These two strains display a significant genetic diversity and belong to two different RVFV lineages (i.e. A and E). The impact of inter-strain and intra-strain genetic diversities on these phenotypes should be investigated, in particular by developing specific reverse genetic systems.

## Acknowledgements

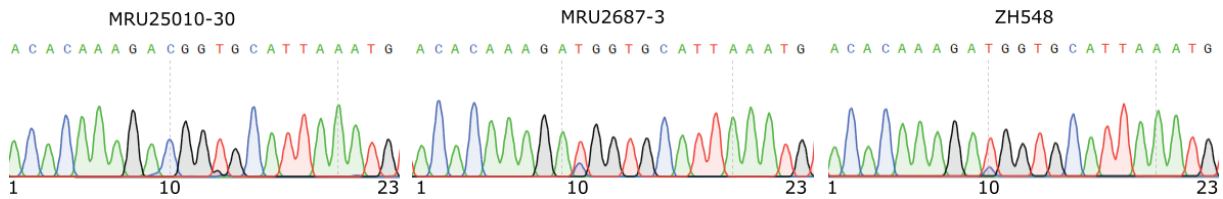
This work was supported by a grant from INRAE GISA metaprogramme 2017 (FORESEE project) and a WOAHP twinning project ISRA/CIRAD on RVF. Mehdi Chabert is PhD student co-financed by Animal Health Department of INRAE and CIRAD.

## Supplementary data

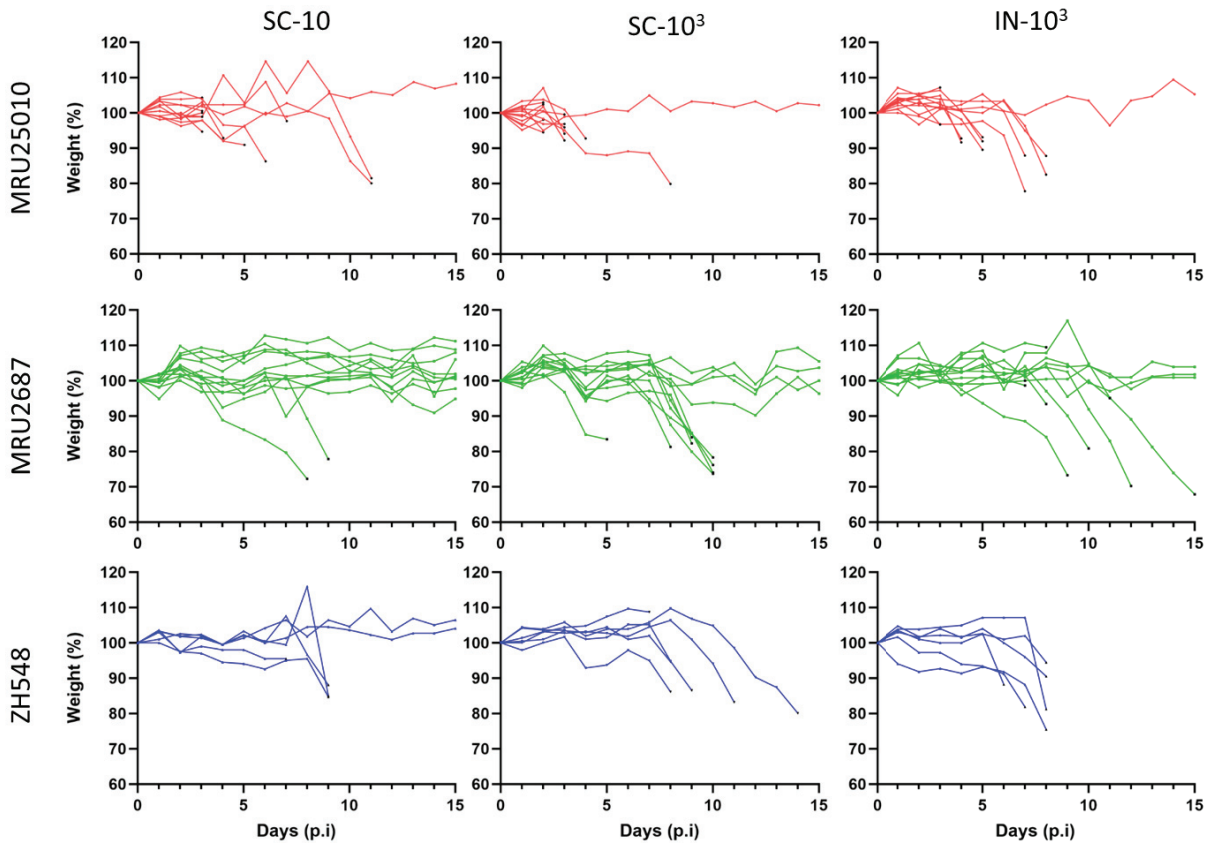
**Table S1 : Amino acid substitutions observed between the consensus sequences of MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains.** Amino acid substitutions are classified by viral segment and related protein. Their position was determined relative to the known initiation codon. Note that the numbering of M segment proteins (NSm, Gn and Gc) starts from AUG1 used to translate p78. Amino acid residues can be classified in four groups based on their polarity (non-polar, polar with no charge on R group, polar with negative charge on R group and polar with positive charge on R group). Amino acid residues conserved between MRU25010-30 and MRU2687-3 are uncoloured. Non-conserved amino acid residues between these two strains but identical between MRU25010-30 and ZH548 strains are coloured in light grey. Non-conserved amino acid residues between MRU25010-30 and MRU2687-3 and from the same group are coloured in grey. Non-conserved amino acid residues and from a different group are coloured in dark grey.

Segment	Protein	Position	MRU25010-30	MRU2687-3	ZH548
S	NSs	23	I	I	F
		90	V	I	I
		111	V	I	I
		167	V	V	A
		217	A	A	V
		242	V	V	I
		245	V	I	I
	262	V	A	V	
	N	159	E	E	G
M	NSm	42	R	G	G
		126	V	I	I
	Gn	232	Q	Q	L
		269	V	I	V
		360	D	N	D

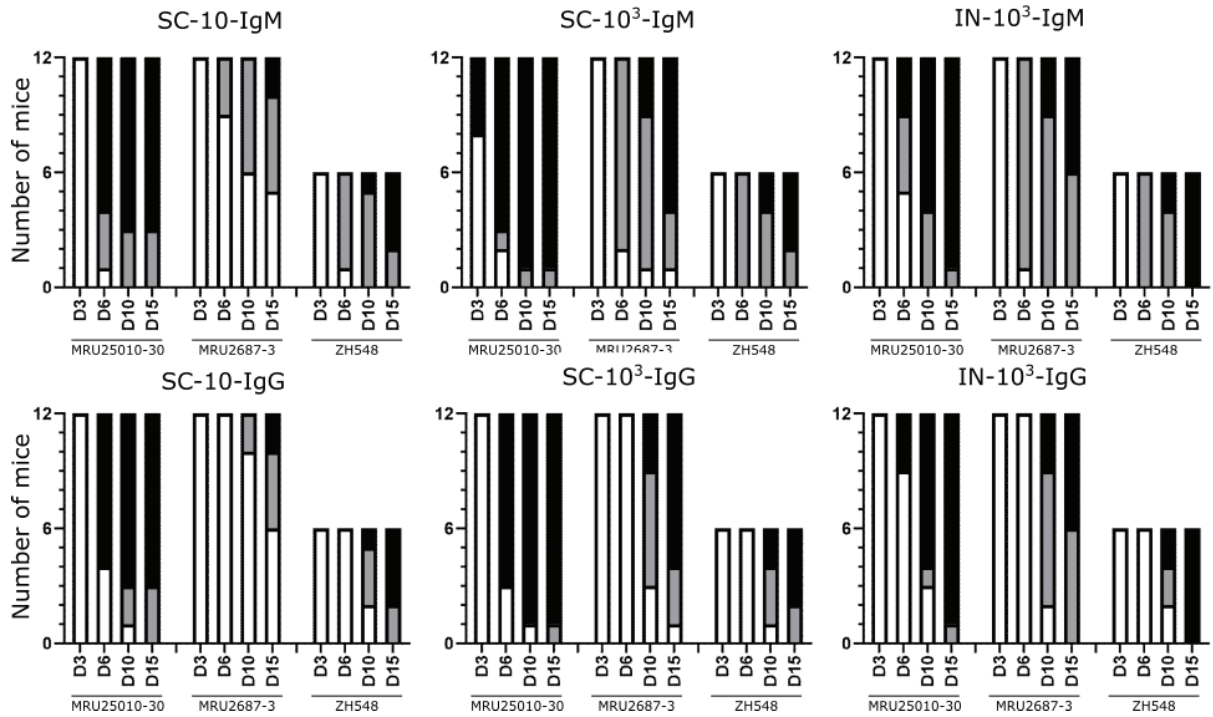
		384	K	T	T
		492	I	V	V
		566	G	G	D
		595	V	I	I
		605	K	R	R
		615	K	R	R
		631	V	V	I
		659	A	V	V
	Gc	739	D	E	E
		747	I	I	L
		1059	T	T	S
L	L	23	Y	Y	F
		120	M	T	M
		157	D	G	G
		177	E	D	E
		249	K	R	R
		278	N	N	S
		288	V	A	A
		302	I	V	V
		336	I	V	V
		350	K	R	R
		406	V	M	M
		407	D	G	G
		411	G	S	S
		470	N	N	S
		493	R	K	R
		663	T	T	A
		840	I	V	I
		1333	I	V	V
		1698	I	V	V
		1751	M	I	I
		1760	V	I	V
		1852	H	Y	H
		1926	R	K	R
1960	E	D	D		
1984	N	N	D		
2033	T	A	A		



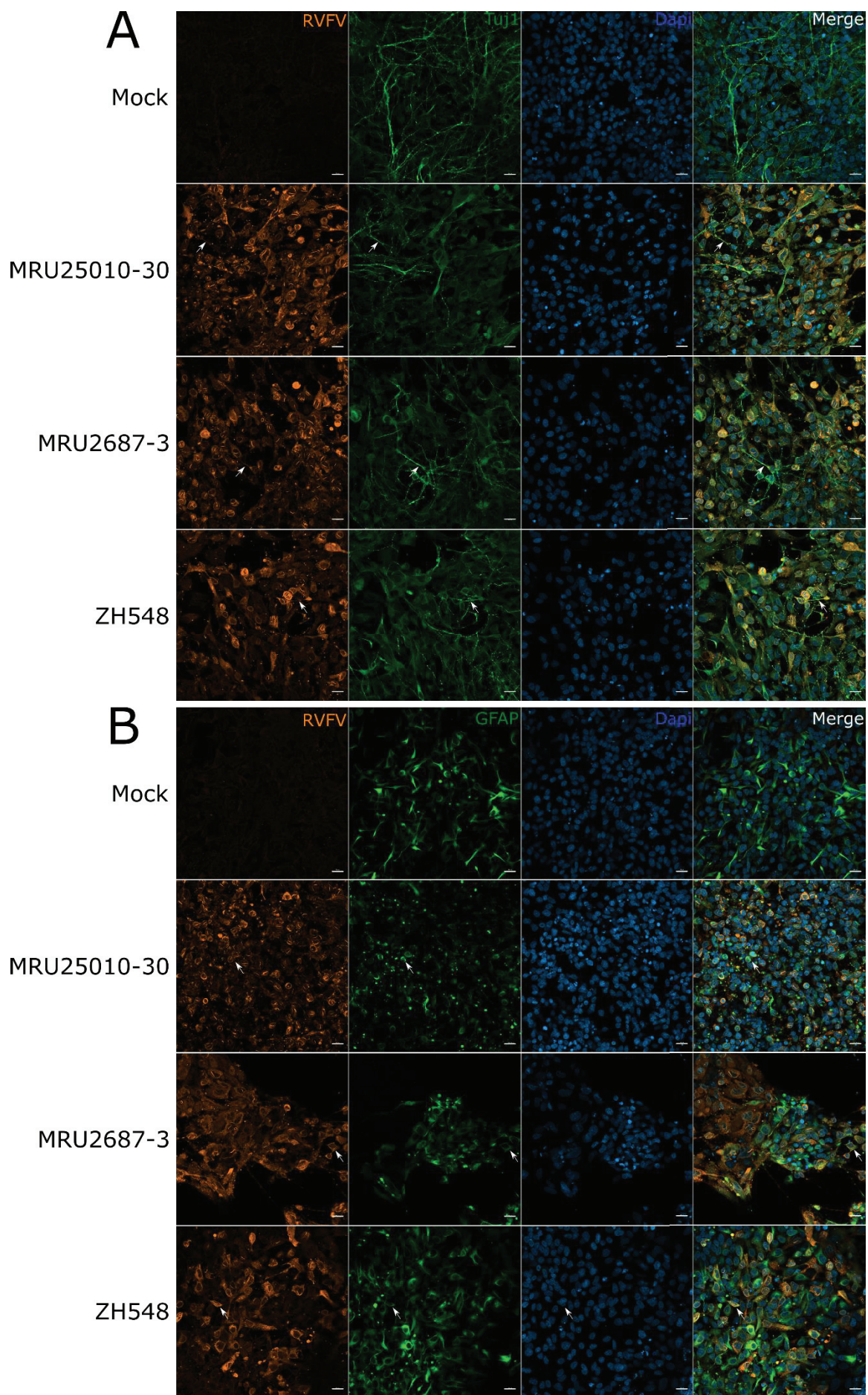
**Figure S1 :** DNA sequencing chromatograms of RACE-PCR products amplified from 5'UTR of anti-genomic *M* segments. Nucleotides at position 10 is either an uracil (U) or a cytosine (C) in MRU2687-3 and ZH548 strains, when no polymorphism has been found in MRU25010-30 strain.



**Figure S2 :** Effect of RVFV infection on BALB/c mice body weight. Mice have been weighted before infection and then every day during the course of the experiment. Weight percentage was calculated relative to that at Day 0 till the death of the animal. Black dots represent the last measure recorded before the death of the animal.



**Figure S3 : Kinetics of seroconversion of mice infected with MRU25010-30, MRU2687-3 and ZH548 strains.** ELISA measurement of IgM and IgG antibodies of mice infected with field strains or ZH548. The sera were collected at day 3, 6, 10 and 15 p.i. Sera of euthanized mice have also been collected and included in the graph as part of the following day of collection. For example, serum of one euthanized mouse at day 5 is included in D6 group. At the indicated day, black bars represent dead mice, grey bars seroconverted mice and white bars mice with non-detectable IgM or IgG antibodies.



**Figure S4 : immunofluorescence microscopy and confocal imaging in hiPSC derived neural cells.** hiPSC derived neural cells have been infected with  $2 \times 10^4$  PFU of the indicated RVFV strain (MRU25010-30, MRU2687-3 or ZH548), fixed at 48h p.i. in 2% PFA solution and analysed by immunofluorescence. (A) Neurons were labelled with anti-Tuj1 antibody (Green) (B) Astrocytes were labelled using anti-GFAP antibody (Green) (A,B) The virus was detected using anti-RVFV mouse ascite (Red). Nuclei were stained using DAPI (Blue). Images were captured at x20 magnification and the scale bars in the bottom right correspond to 20  $\mu$ m.

Durant cette étude, nous avons pu réaliser une caractérisation de deux souches isolées provenant de Mauritanie (2010 et 2013) avec une série d'approches complémentaires *in vivo*, *in vitro* et *in silico*. Ce fut un travail impliquant de nombreuses collaborations ce qui s'est avéré être très enrichissant à la fois intellectuellement mais aussi pour ma capacité à gérer les partenariats.

Les signes cliniques induits par la FVR varient fortement et il est clair que des facteurs propres à l'hôte tels que l'espèce, l'âge ou l'état physiologique et immunitaire peuvent moduler la sévérité de la maladie. Cependant, l'influence de la diversité génétique du RVFV sur cette dernière est encore mal connue. J'ai pu montrer tout d'abord que les deux souches, MRU25010-30 et MRU2687-3, faisaient partie de deux lignées génétiques distinctes (E et A, respectivement) et qu'elles n'étaient pas le fruit d'un réassortiment de segment entre deux virus de lignées différentes. J'ai identifié plusieurs substitutions d'acides aminés potentiellement intéressantes. Quatre se trouvent dans la protéine L, l'ARN polymérase ARN dépendante du virus (D157G, D407G, G411S et T2033A), bien qu'elles ne soient pas dans des domaines fonctionnels déjà identifiés de cette protéine. Deux autres sont retrouvées dans les protéines NSm (R42G) et Gn (K384T) codées par le segment M. De façon intéressante, nous avons pu montrer que la diversité génétique au sein même de chacune de nos souches était beaucoup plus importante sur le segment M que sur les deux autres segments avec notamment de nombreuses substitutions au niveau de la protéine Gn. Toujours à propos du segment M, le séquençage profond combiné à l'approche de RACE-PCR, m'a permis de découvrir que les souches MRU2687-3 et ZH548 présentaient une sous-population virale avec des séquences contenant un codon AUG supplémentaire et situé en amont de l'AUG1.

L'étude de la virulence de ces souches a permis de montrer tout d'abord que la souche MRU25010-30 induisait la mort rapide des souris avec une virémie et une charge virale importante dans le foie. De façon intéressante, cette souche semble aussi pouvoir atteindre de façon précoce le cerveau des souris infectées puis s'y répliquer efficacement. Comparativement, les souches MRU2687-3 et ZH548 se répliquent aussi dans le foie des animaux mais la plupart des souris survivent à cette première vague de l'infection contrairement à celles infectées par MRU25010-30. La mort des souris est plus tardive pour ces deux souches et est corrélée à la présence du virus dans le cerveau.

J'ai ensuite montré que la souche hyper virulente MRU25010-30 se réplique aussi plus efficacement *in vitro* dans des cellules hépatiques et dans une multiculture de cellules neurales et gliales humaines, complétant ainsi les données obtenues en modèle murin. Enfin, l'étude comparative en cellules A549 et A549NPro suggère que la réponse IFN-I a le même impact sur les deux souches. Ceci est à mettre en corrélation avec le fait que je n'ai pas identifié de substitutions potentiellement intéressantes dans la protéine NSs, connue pour inhiber la réponse IFN-I. Ces données restent cependant préliminaires. Pour aller plus loin, j'envisagerais dans un premier temps de, par exemple, quantifier la quantité d'IFN-I produit par les cellules infectées en fonction de la souche utilisée.

En conclusion de cette première partie, les données montrent que les deux souches isolées en Mauritanie présentent des caractéristiques génomiques, une virulence et des capacités répliquatives différentes. Je possède donc tous les « outils » pour poursuivre les objectifs initiaux et identifier les facteurs viraux impliqués dans les différences observées.

## 4 Résultats (Partie 2)

La caractérisation des souches de RVFV isolées en Mauritanie lors des épidémies de 2010 (MRU25010-30, dromadaire) et 2013 (MRU2687-3, chèvre) nous a permis de mettre en évidence des différences importantes entre ces deux souches.

Au regard, notamment, du polymorphisme génétique et des différences marquées en termes de capacités répliquatives *in vitro* des souches MRU25010-30 et MRU2687-3, j'ai décidé de développer un système de génétique inverse permettant de travailler avec des séquences virales contrôlées et homogènes afin d'identifier les déterminants moléculaires viraux à la base des phénotypes distincts observés. Ce système m'a permis de mettre en place une approche sans *a priori*, basée sur le réassortiment des segments génomiques que j'ai ensuite complété par des mutations ciblées en me basant sur la diversité génétique inter- et intra-souche que j'ai décrite dans la première partie de mes résultats.



# Genetic diversity of Rift Valley fever Virus M-Segment modulates viral fitness

Mehdi Chabert Ben Cherifa<sup>1,2,3</sup>, Marie-Pierre Confort<sup>1</sup>, Baba Doumbia<sup>4</sup>, Mohamed Bezeid Ould El Mamy<sup>5</sup>, Moustapha Lo<sup>6</sup>, Catherine Cêtre-Sossah<sup>2,3</sup>, Frédérick Arnaud<sup>1</sup> et Maxime Ratinier<sup>1</sup>

1 IVPC UMR754, INRAE, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, EPHE, PSL Research University, F-69007 Lyon, France.

2 CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier Cedex, France

3 ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France

4 Direction des Services Vétérinaires, Nouakchott, Mauritania

5 ONARDEL, Nouakchott, Mauritania

6 ISRA-LNERV, Dakar, Senegal

## Abstract

Rift Valley fever virus (RVFV) is the causative agent of a major arthropod-borne zoonotic disease that is circulating throughout Africa, Indian Ocean islands and the Arabian Peninsula. In ruminants, RVFV is responsible of high abortion and neonatal mortality rates and causes dramatic economic consequences for livestock farmers and affected countries. In humans, RVF is an acute febrile disease that can lead in 1-3 % of cases to haemorrhagic, ocular, and neurological disorders. Since 1987, RVFV is particularly active in Western African countries and is now considered as endemic in Senegal and Mauritania. We previously characterised two viral strains isolated during outbreaks that occurred in Mauritania in 2010 and 2013, showed that they belong to two distinct genetic lineages with striking differences in terms of virulence in BALB/c mouse model and *in vitro* growth properties. In this study, we developed reverse genetics system adapted to these two strains in order to identify the viral molecular determinants affecting RVFV replication. Genomic segment reassortment and directed-mutation approaches allowed us to identify a combination of two mutations within the M-segment that impact RVFV replication. Furthermore, we showed that the K384 residue within Gn envelope protein promotes the production of infectious particles but without interfering with the entry step of the virions. Altogether, the data obtained in this study unveil previously uncharacterised molecular determinants modulating *in vitro* RVFV fitness.

## Introduction

Rift Valley fever virus (RVFV), a *Phlebovirus* member of the *Phenuiviridae* family within the order of *Bunyavirales*, is responsible of a severe zoonotic disease affecting predominantly ruminants and humans (Hartman 2017). RVFV displays an unusual broad spectrum of competent vectors, mainly mosquitoes of the *Culex* and *Aedes*

genera, and its transmission to humans through direct contact with infected tissues or fluids is well established (Pepin *et al.* 2010; Reed *et al.* 2013a).

Since its first description in 1930 in Kenya, RVFV has been reported in most of the sub-Saharan African countries as well as in the Arabian Peninsula (Clark *et al.* 2018; Madani *et al.* 2003). In West Africa, the virus is now considered as endemic and several major outbreaks occurred, particularly in Senegal and Mauritania, since the first outbreak reported in 1987 at the border of these two countries (Reed *et al.* 2013a; Caminade *et al.* 2014). RVFV may cause severe disease that is characterised by liver and/or brain damages, potentially leading to fulminant hepatitis, encephalitis, meningitis and/or retinitis (Coetzer 1977; Ikegami et Makino 2011). The mortality rate in young animals is high and can reach 90% of infected lambs (Nuria Busquets *et al.* 2010). RVF is also characterised by an abortion wave among pregnant females of affected flocks (Daubney *et al.* 1931). Until recently, camelids were considered as healthy or weakly symptomatic carriers, although infected pregnant females may also suffer of abortion and neonatal death is observed (Nielsen *et al.* 2020). However, in 2010, severe clinical signs of RVF were reported in dromedaries in Mauritania; an hyperacute form with sudden death in 24 hours and an acute form with fever, oedema on the neck, ocular discharge, blindness associated with nervous symptoms and abortions (El Mamy *et al.* 2011). The outbreak started a few weeks after unusual heavy rainfall in the northern desertic region of Adrar and was responsible for numerous human deaths as well as abortion storms in small ruminants (Sow *et al.* 2014; Faye *et al.* 2014; El Mamy *et al.* 2014). A major RVF outbreak in Senegal occurred in 2013-14, with multiple foci = recorded throughout the country as well as in Dakar urban area (Seck *et al.* 2022; Sow *et al.* 2016). Interestingly, molecular epidemiological studies showed that viruses from at least three distinct RVFV genetic lineages had circulated so far in this area (Grobbelaar *et al.* 2011; Bob *et al.* 2022). We showed previously that the MRU25010-30 strain (isolated from a camel serum in the Adrar region, 2010) and the MRU2687-3 strain (isolated from an aborted goat liver in the Brakna region, 2013) clustered in two distinct genetic lineages (E and A, respectively), according the classification proposed by Bird and colleagues (Bird *et al.* 2007). Additionally, we found by deep- and RACE-sequencing that genetic diversity within these two minimally passaged RVFV strains (viral subpopulations or quasispecies) was very low. Moreover, the MRU25010-30 strain was proved to be highly virulent in BALB/c mouse model and replicated more efficiently in various *in vitro* cell culture conditions than the MRU2687-3 strain.

RVFV is a tri-segmented single-stranded RNA virus of negative or ambisense polarity (Bouloy et Weber 2010). Its genome is composed of three segments, named L, M and S, according to their length. The L (Large; 6404 nucleotides, nts) segment carries a single open reading frame that encodes the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) involved in the transcription and replication processes. Depending on the nucleotides used as start codons, the RVFV Segment M (Medium; 3881 nts) can be translated into four in-frame polyproteins that are subsequently cleaved by cellular proteases into several viral proteins: i) one long glycoprotein, p78 or LGp required for dissemination in mosquitoes, ii) two non-structural proteins, NSm and NSm', and iii) two surface glycoproteins, Gn and Gc. (Kakach *et al.* 1989; Won *et al.* 2006).

Finally, the S (Small; 1691 nts) segment possesses an ambisense coding strategy leading to the expression of the nucleoprotein (N) that is associated with the RNA genome molecules and formed the ribonucleoproteins (RNPs), together with RdRp; positive strand) and the Non-Structural protein of S-segment (NSs; negative strand) (Gauliard *et al.* 2006).

RVFV displays a broad cellular tropism and its entry into the cells is mediated by the viral glycoproteins Gn and Gc (Koch *et al.* 2021). The entry step of the viral particle likely involved several host factors such as C-type lectin molecules, heparan sulphates or the more recently identified low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) (Léger *et al.* 2016b; Lozach *et al.* 2011a; de Boer *et al.* 2012a; Ganaie *et al.* 2021a). Upon entry, the acidification in the late endosome allows the translocation of the RNPs into the cytoplasm of the infected cells by triggering conformational change of class II fusion protein Gc and membrane fusion (de Boer *et al.* 2012; Dessau et Modis 2013; Halldorsson *et al.* 2018b). Viral RNAs are then rapidly transcribed, translated and replicated in the cytoplasm. The doubling time of viral segments quantity has been estimated at 40 min with the amount of viral RNAs reaching a plateau between 6 to 8h post-infection (Schreur et Kortekaas 2016a). Gn and Gc form heterodimers that are retained in the Golgi due to the presence of a Golgi-retention signal located within the C-terminal cytoplasmic tail of Gn that also interacts with newly formed RNPs complexes (Gerrard et Nichol 2002b; Carnec *et al.* 2014). Virions are then budding into the lumen of the Golgi apparatus and matured viral particles exit the cell *via* exocytosis pathway (Schreur et Kortekaas 2016a).

The NSs protein is considered as the major factor of virulence of RVFV through its ability to (i) inhibit IFN-I pathway and host transcription, (ii) induce the degradation of PKR to sustain viral protein synthesis (Muller *et al.* 1995a; Billecocq *et al.* 2004; Le May *et al.* 2004; Ikegami *et al.* 2009b). The role of NSm protein is still unclear as it has been shown to be dispensable for viral replication *in vitro* (Won *et al.* 2006; Gerrard *et al.* 2007). However, it was shown that RVFV NSm proteins localize in the outer mitochondrial membrane of infected mammalian cells and display anti-apoptotic activity (Terasaki *et al.* 2013; Won *et al.* 2007a). Moreover, the NSm/NSm' proteins are involved in the virulence of RVFV in immune-competent C57BL/6 mice (Kreher *et al.* 2014). Interestingly, a study carried out on vaccine MP-12 strain clearly indicated that mutations within the three segments are required to fully attenuate the virulence of ZH501 strain, especially three amino acid residues located in RdRp, Gn and Gc proteins (Ikegami *et al.* 2015), suggesting that viral proteins other than NSs and NSm may participate to RVFV pathogenesis. Supporting this idea, study of the M segment of a viral subpopulation found in a ZH501 stock revealed that a single non-synonymous substitution within Gn protein affect the RVFV virulence in CD-1 mice (Morrill *et al.* 2010c).

In this study, we developed a reverse genetics system based on both MRU25010-30 and MRU2687-3 strains in order to identify the viral genetic determinants responsible for the different replication properties observed between these two RVFV field strains. By reassorting viral segments, we showed that M-segment of MRU25010-30 confers a clear replication advantage to this strain. Moreover, our results showed that the combination of two mutations, one in the 5'UTR (positive strand; U10C) and

another one within Gn coding region (A1171C), is necessary and sufficient to support high replication kinetics observed for the MRU25010-30 strain. Further investigations showed that the K384 residue in Gn B domain promoted the production of infectious viral particles, but not the entry step of the virions into the host cells. Overall, these results revealed two molecular determinants carried by the M segment of field strains acting in combination to drastically alter *in vitro* replication of RVFV.

## Materials and Methods

### Cells

VeroE6, A549 (kindly provided by Richard E. Randall, University of St Andrews, UK), BSR (a clone of BHK21 cells, obtained from Karl K. Conzelmann, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany) (Buchholz, Finke, et Conzelmann 1999) and BSR T7 clone 21 cells (BSR cells expressing T7 polymerase, kindly provided by Alain Kohl, MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, UK) (Mottram *et al.* 2017) were grown in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco). All cell lines were grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

### Reverse genetics plasmids and mutagenesis

The reverse genetics system based on the RVFV strains MRU25010-30 (El Mamy *et al.* 2014) and MRU2687-3 (Cêtre-Sossah *et al.* 2019) is based on the consensus sequences described in Results section, part I, and has been set up as follows. First, RNA was extracted from infected VeroE6 cells using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's protocol. Viral antigenomic L, M and S RNA segments of each RVFV strain were then reverse transcribed using PrimeScript RT reagent kit (Takara, France), amplified by PCR with CloneAmp HiFi PCR premix (Takara, Japan) and cloned into a linearized pTVT7 plasmid using In-fusion Cloning (Takara, Japan). Briefly, the resulting reverse genetics plasmids contain the antigenomic viral segments (positive sense) flanked at the 5' end by a T7 promoter (5') and at the 3' end by an HDV ribozyme and T7 terminator sequences. All the mutants used in this study were obtained by PCR using CloneAmp HiFi PCR premix (Takara, Japan). PCR products were treated with DpnI for 1 hour at 37°C and size-based purified on agarose gels. All plasmids used in this study were amplified in STELLAR bacteria (Takara, Japan), purified with NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey-Nagel, Germany) and verified by Sanger sequencing. Primers used to obtain reverse genetics plasmids are listed in Table S2.

### Viruses and reverse genetics viruses

The MRU25010-30 (isolated from a camel in 2010) and MRU2687-3 (isolated from goat in 2013) strains have been isolated from two distinct outbreaks of Mauritania (El Mamy *et al.* 2011; El Mamy *et al.* 2014; Sow *et al.* 2016) and passaged twice in VeroE6 cells. Reverse genetics viruses have been obtained by transfecting equal amount of the three reverse genetics plasmids (0.6 µg each) into BSR T7 clone 21 cells using Lipofectamine 2000 (6 µL; Thermo Fisher Scientific) and following the manufacturer's protocol. After 4 hours, the transfection media were replaced by DMEM

supplemented with 4% FBS. Supernatants were harvested 4 to 5 days post transfection (pt), aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For each virus, we confirmed by RT-PCR and Sanger sequencing of each segment the identity of the virus/strain and, when necessary, the presence of the expected mutation (primers used are listed in Table S1).

All virus stocks were produced in VeroE6 cells grown in DMEM 4% FBS. Supernatants were harvested 2 to 3 days post infection (p.i.), aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Virus titers were subsequently determined on VeroE6 cells by standard plaque assays using an agarose overlay (2.5%). Briefly, infected VeroE6 cells were incubated for 5 days, then fixed in 4% formaldehyde solution and stained with crystal violet to visualize plaques due to virus-induced cytopathic effect (CPE). All viral stocks titers are expressed as plaque-forming units/mL (PFU/mL). Alternatively, after fixation, the cells were permeabilised with 1% Triton X100 for 15 min at room temperature (RT) and stained over night at  $4^{\circ}\text{C}$  with a mouse anti-RVfV ascite at a 1:500 dilution (Chrun *et al.* 2018). The foci were revealed with an HRP-sheep anti mouse IgG (A5906 Sigma) at a dilution of 1:2500 for 1h at  $37^{\circ}\text{C}$ . HRP enzymatic activity was revealed using True Blue KPL® substrate, Viral stock titers were expressed as foci-forming units/mL (FFU/mL).

### Virus growth curves

A549 cells were infected with the indicated virus at a multiplicity of infection (MOI) of 0,01 in DMEM supplemented with 4% FBS. Two hours p.i., the inoculum was carefully removed, cells were washed and fresh media was added. The supernatants were collected at 24h and 48h p.i. and titrated in BSR cells by endpoint dilution method. Viral titers are expressed as  $\log_{10}$  50% tissue culture infective doses ( $\log_{10}$  (TCID<sub>50</sub>)/ml) determined by Spearman-Kärber method (Kärber 1931). Each experiment was conducted three times independently using at least two different stocks of each virus. Statistical analyses were realised by Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test using GraphPad Prism software.

### Viral binding and entry assays

**Viral binding assay.** A549 cells were placed on ice and incubated with either rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384 (MOI=2) viruses for 0, 5, 10, 15, 30, 40 and 60 minutes. At these different timepoints, the inocula were removed, the cells were carefully washed and further incubated in prewarmed media at  $37^{\circ}\text{C}$  for 2h to enable the attached viral particles to enter within the cells. The media were then replaced with another one containing 50 mM of ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) to prevent any further viral entry. After 8h of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , the cells were fixed in 4% PFA solution. These experiments have been repeated three times independently with two different virus stocks.

**Viral entry assay.** A549 cells were cooled on ice for 15 min prior to be incubated for 1h, still on ice, with either rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384 (MOI=2). Next, the inocula were carefully removed, cells were washed and the incubated with prewarmed media at  $37^{\circ}\text{C}$  for 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 and 120 min). At each time point, the media were replaced with a new one containing 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to block

virus entry. After 8h incubation at 37°C, cells were fixed in 4% PFA solution. This experiment has been performed twice independently, using two different virus stocks.

**FACS analysis.** Fixed A549 cells were permeabilized using 1% Triton X100 solution, blocked firstly with PBS 0.1% Tween 20 containing 0.4% gelatine from cold water fish skin (Sigma, G7041), and secondly with PBS 0.1% Tween20 containing 2.5% Normal Goat Serum (NGS, Sigma, I9140). Cells were then incubated overnight at 4°C with anti-RVFP mouse ascites (Chrun *et al.* 2018), and subsequently with anti-mouse coupled with PE-Cy7 (ab130790 abcam). Cells were analysed by a BD FACS Canto A to quantify the percentage of PE-Cy7-positive cells in order to determine the percentage of RVFP infected cells. The binding and entry efficiency were calculated with the logistic model using R environment (Cramer 2003).

### Viral release assay

A549 cells were infected with rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384 at a MOI of 2 and incubated 2 hours. The inocula were then removed, the cells were washed extensively and further incubated at 37°C in DMEM supplemented with 10%FBS for 6h p.i. Cells (cellular fraction) were washed with Phosphate-buffered saline solution (PBS) and total RNA was extracted using Trizol reagent (Thermo Fischer Scientific), according to the manufacturer's instructions. Supernatants (virions fraction) were split in two aliquots to (i) assess viral titers by foci-forming assay (FFU/ml), and (ii) extract viral RNA from supernatant using Viral RNeasy kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions RNA extracted from the cellular and virions fractions were reverse transcribed by targeting the negative strand of L or M segments using PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara) and according to manufacturer's protocol. The qPCR reactions were performed with TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus) (Takara Bio) according to the manufacturer's protocol. The data were analysed using Agilent AriaMx software. Number of segments L and M copies were calculated using home-made standard curves. L (90 nts) and M (89 nts) RNAs corresponding to qPCR amplicon used to generate the standard curve were obtained using T7 RiboMAX™ Express Large-Scale RNA Production System (Ozym) from homemade plasmid containing L et M amplicon inside a T7 expression cassette. All the primers used for the RT-qPCR analysis are listed in Table S2 (Bird, Bawiec, *et al.* 2007; Drosten *et al.* 2002).

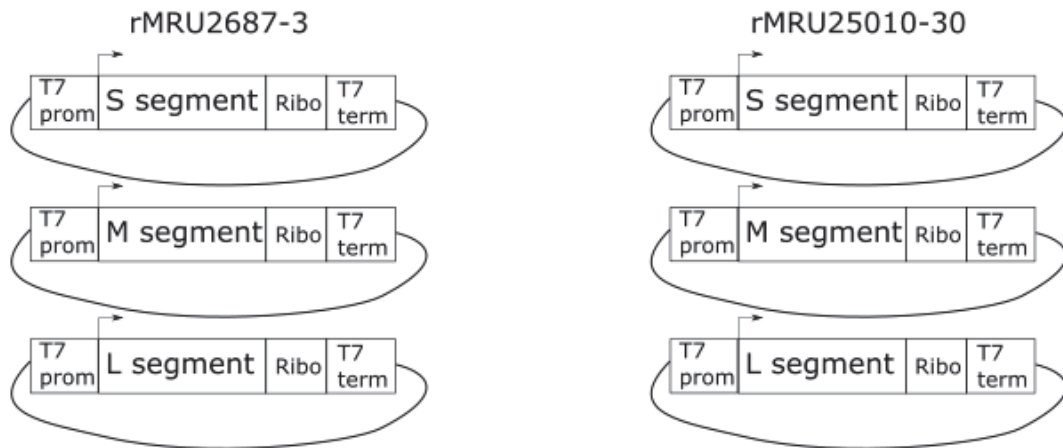
## Results

### Characterisation of reverse genetics viruses

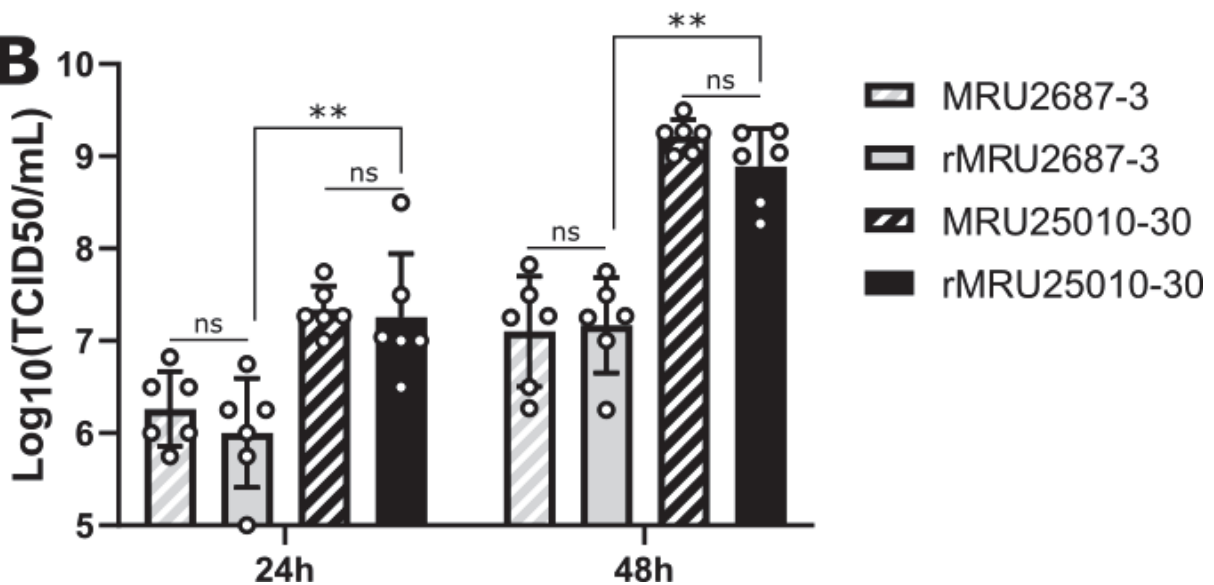
We developed the reverse genetics system (RG) of two RVFP field strains originated from Mauritania: MRU25010-30 and MRU2687-3 respectively isolated from a camel in 2010 and a goat in 2013. To this end, we generated a set of three plasmids for each strain based on the consensus sequences of their three genomic segments (Figure 36A). We then assessed the replication kinetics of both rescued viruses (rMRU25010-30 and rMRU2687-3) and the two original strains (MRU25010-30 and MRU2687-3) in human A549 cells infected at a MOI of 0.01 (Figure 36B). Both rescued viruses grew in a comparable manner compared to their respective original viruses at 24h and 48h

Moreover, as expected, rMRU25010-30 and its original strain displayed a high replication rate with viral titers in the cell supernatants that are 10 to 100-fold higher than the MRU2687-3 viruses (respectively at 24h and 48h pi) ( $p = 0.005$ ). Altogether, these data showed the relevance of the viral sequences used for our RG system.

**A**



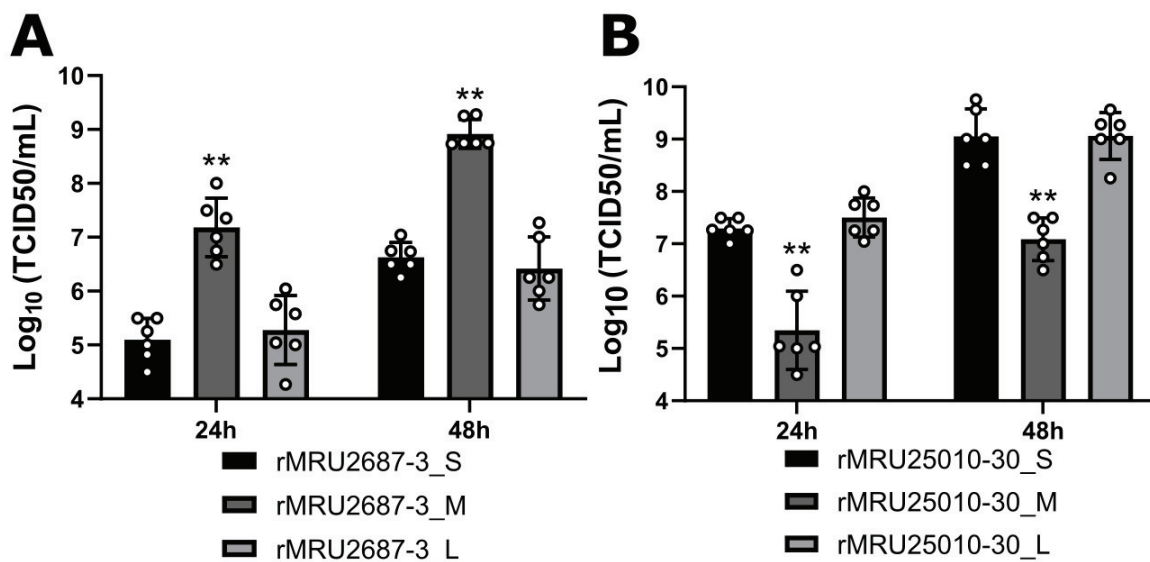
**B**



**Figure 36** : Characterisation of the rescued rMRU2687-3 and rMRU25010-30 viruses (A) Schematic representation of RG plasmids used in this study. RVFV genomic segments were inserted between a T7 promoter “T7 prom” (at the 5’end) and the HDV ribozyme “Ribo” and T7 terminator sequences “T7 term” (at the 3’end). (B) Viral growth curves in A549 cells. Cells were infected at a MOI of 0.01 and the cell supernatants were collected at 24h and 48h pi. The graph indicated viral titers measured by TCID<sub>50</sub> method and expressed as log<sub>10</sub> (TCID<sub>50</sub>/ml). This experiment was repeated three times, each time in duplicate. The error bars represent standard deviations around the mean value (SEM). Kruskal-Wallis post-hoc Dunn’s statistical analyses were performed, significance is presented as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*). No significance difference (ns) was observed between rescued viruses (rMRU25010-30 and rMRU2687-3) and their corresponding original strains (MRU25010-30 and MRU2687-3).

*in vitro* growth properties observed for MRU25010-30 and MRU2687-3 strains

To identify which segment or combination of segments carries the viral genetic determinant(s) responsible for the growth dissimilarity observed between rMRU25010-30 and rMRU2687-3, we generated reassortant viruses by exchanging each of segment of each of the strain in the backbone of the other virus. A549 cells were infected with a MOI of 0.01 and supernatants were collected at 24 and 48h pi (Figure 37). Measurement of the infectious viral titers revealed that rMRU2687-3 bearing the segment M of the MRU25010-30 (namely rMRU2687-3\_M) displayed a significantly higher replication rate (approximately 100 times more at both 24h and 48h pi) than the two other rMRU2687-3 recombinant viruses bearing respectively the L and S segment (i.e. rMRU2687-3\_L and MRU2687-3\_S) (Figure 37A) and at levels comparable to rMRU25010-30 (Figure 36B). This result indicated that segment M of MRU25010-30 is necessary and sufficient to confer a replication advantage in rMRU2687-3 genetic background. Next, we tested if the corollary was true in the rMRU25010-30 backbone (Figure 37B). In this context, rMRU25010-30\_S and rMRU25010-30\_L viruses showed similar titers at both 24h and 48h pi, and grew in a comparable manner with rMRU25010-30 (Figure 36B). On the contrary, rMRU25010-30\_M replicated significantly less efficiently than the others suggesting that segment M of MRU2687-3 is impairing the *in vitro* viral fitness. Altogether, our data clearly indicated that the segment M the two RVFV strains investigated in this study differentially impact *in vitro* viral replication kinetics



**Figure 37 : Growth properties of reassortant viruses.** Using RG system, reassortant viruses have been generated by combining one segment (S, M or L) of a given strain into the genetic background of the other strain: (A) MRU2687-3 backbone bearing S, M or L segments of MRU25010-30 and (B) MRU25010-30 backbone bearing S, M or L segments of MRU2687-3. A549 cells have been infected at a MOI of 0.01 and the cell supernatants were collected at 24h and 48h pi. The graphs indicate the viral titers of the cell supernatants analysed by TCID50 method and expressed as log<sub>10</sub> (TCID50/ml). This experiment was repeated three times independently, each time in duplicate. The error bars represent standard deviations around the mean values. Kruskal-Wallis post-hoc Dunn's statistical analyses were performed and significance is presented as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

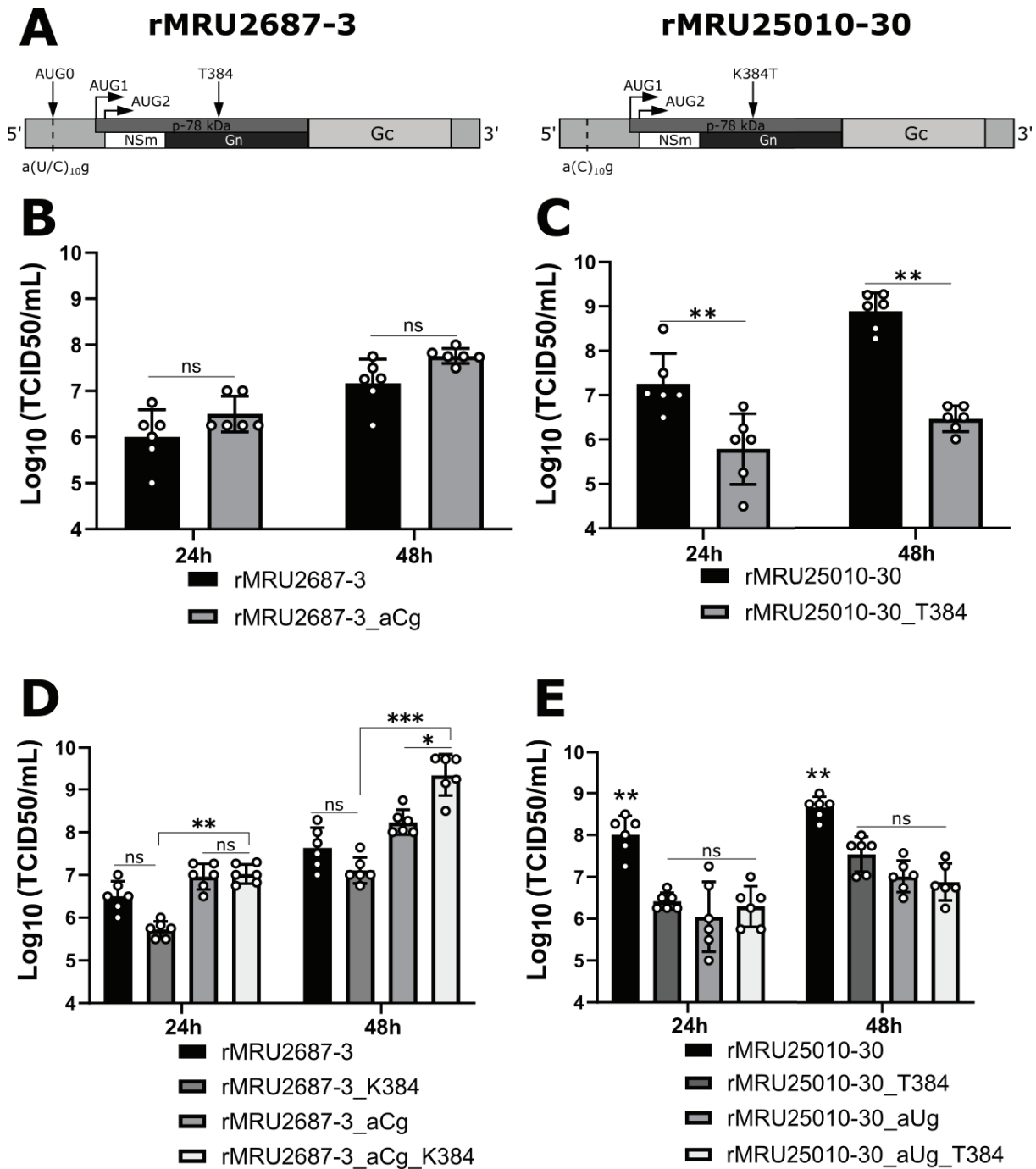


## Effect of the genetic diversity of the viral subpopulation on the replication of rMRU2687-3 and rMRU25010-30

Initially, the original MRU25010-30 and MRU2687-3 strains have been passaged twice before full-genome sequencing. Interestingly, we found that segment M sequences within each of these two strains exhibit some genetic polymorphism and in particular two mutations of interest (Results section, part I). The first one is the nucleotide at position 10 (antigenome, MRU2687-3 strain) within the 5'UTR being either an uracil (U, in majority) or a cytosine (C, present in 5% of reads). It leads to the presence or absence of a putative initiation codon AUG, named AUG0, shortly followed by a stop codon (UAA) and located immediately downstream AUG1 (Figure 38A). Notably, the segment M of the MRU25010-30 strain displayed a C at position 10. The second one is the nucleotide at position 1171 (antigenome, MRU25010-30 strain) of segment M that is highly variable and leads to a non-synonymous substitution of the amino acid residue at the position 384 of the M polyprotein (K $\approx$  49%; T  $\approx$ 43% or R $\approx$ 7%), corresponding to Gn coding sequence (Figure 38A). It is important to note that the MRU2687-3 strain bears a T at this position of its Gn protein.

Using our reverse genetics system, we next aimed to determine the effect of these two mutations on RVFV replication capacity. To this end, we generated rMRU2687-3\_aCg virus to test, in A549 cells, the effect of the mutation U to C on the RVFV replication. As shown in figure 38B, no significant difference of the infectious viral titers (at both 24h and 48h pi) was observed between rMRU2687-3 (bearing an aUg) and rMRU2687-3\_aCg viruses, suggesting that the polymorphism observed at the position 10 does not impact viral growth in this genetic background (Figure 38B). Next, we generated the rMRU25010-30\_T384 virus (containing the A1171C mutation) encoding a threonine (T) instead of a lysine (K) at position 384 of Gn. Overtime, we observed that rMRU25010-30\_T384 infected A549 cells produced significantly lower number of viral infectious particles than those infected by rMRU25010-30 (1 and 2 log<sub>10</sub>(TCID<sub>50</sub>/ml) differences at 24h and 48h pi, respectively) (p-value = 0.0063 and 0.0049 respectively) (Figure 38C). This result indicated that K384 residue confers a strong replication advantage to rMRU25010-30 in A549 cells. Therefore, we decided to evaluate the effect of this mutation within the genetic background of rMRU2687-3. Surprisingly, rMRU2687-3\_K384 replicated slightly less efficiently than rMRU2687-3 with a not statistically significant difference (figure 38D). Indeed, we measured a reduction of the viral titers of approximately 10-fold at 24h pi, and, even if the gap narrowed, the viral titer of rMRU2687-3\_K384 is still lower at 48h pi compared to that of rMRU2687-3. These data showed that the K384 is necessary to promote viral fitness but not sufficient as its effect is only observed in the genetic context of the rMRU25010-30 segment M. As previously mentioned, another genetic nucleotidic polymorphism was detected at position 10 of the segment M (aUg in MRU2687-3 *versus* aCg in rMRU25010-30). Thus, we were wondering if these two genetic polymorphisms could influence each other in the context of RVFV segment M. To test this hypothesis, we generated a rescued virus in the rMRU2687-3 genetic background but bearing a C at the position 10 (aCg) of its 5'UTR and a K384 residue in the Gn protein. We found that the resulting virus, rMRU2687-3\_aCg\_K384, replicated very

efficiently and reached titers over  $9 \log_{10}(\text{TICD50}/\text{mL})$  at 48h pi, comparable to rMRU25010-30 virus (Figure 38D). Taken together, these results revealed that, *in vitro*, K384 residue in the Gn protein strongly promoted the viral fitness but its effect is dampened by the presence of AUG0 within the 5'UTR. To confirm these data, we introduced the C10U mutation in the context of both rMRU25010-30 (rMRU25010-30\_aCg) and rMRU25010-30\_T384 (rMRU25010-30\_aCg\_T384). As shown in the figure 38E, rMRU25010-30 reached significantly higher titers, at both 24h and 48h pi than the three other rescued viruses. Altogether, these data further demonstrated that AUG0 acts as a dominant negative modulator of the effect of K384 in promoting the RVFV replication.

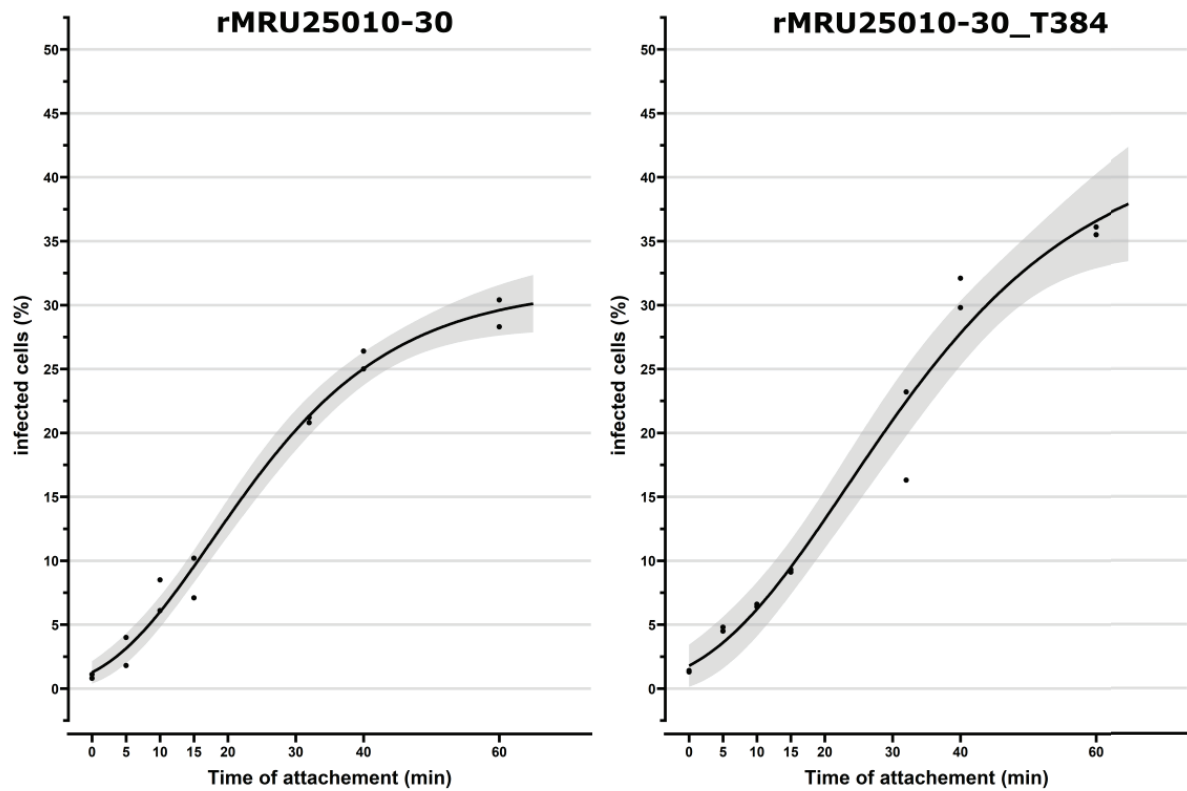


**Figure 38 : Impact of AUG0 and/or T384K mutations on the viral replication of the two RVFV strains.** (A) Schematic representation of segment M genetic diversity observed in either MRU2687-3 or MRU25010-30. AUG1 corresponds to the start codon of p78 and AUG2 initiates the translation of NSm protein. MRU2687-3 segment M contains an additional AUG in the 5'UTR, named AUG0. MRU25010-30 strain is composed of two subpopulations not containing ATG0 but having at position 384 (numbered from AUG1 codon) either a lysine (K) or a threonine (T). Note that MRU2687-3 strain has a conserved threonine (T) residue at this position. (B-E) A549 cells have been infected with the indicated viruses at a MOI of 0.01 and cell supernatants collected at 24h and 48h pi. and titrated by TCID50 method to determine the viral titers expressed as  $\log_{10}(\text{TCID50/ml})$ . Graphs represent the growth curve experiments with the rMRU2687-3 and its corresponding recombinant viruses containing a C at position 10 (rMRU2687-3\_aCg) (panel B), K384 (rMRU2687-3\_K384) or both (rMRU2687-3\_aCg\_K384) (panel D) or the rMRU25010-30 and its corresponding recombinant viruses containing T384 (rMRU25020-30\_T384) (Panel C), an aUg at position 10 (rMRU25020-30\_aUg), or both (rMRU25020-30\_aUg\_T384) (panel E). All experiments were repeated three times independently, each time in duplicate. The error bars represent standard deviations around the mean values (SEM). Kruskal-Wallis statistical post-hoc Dunn's analyses were performed and significance is presented as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), ns (non-significant).

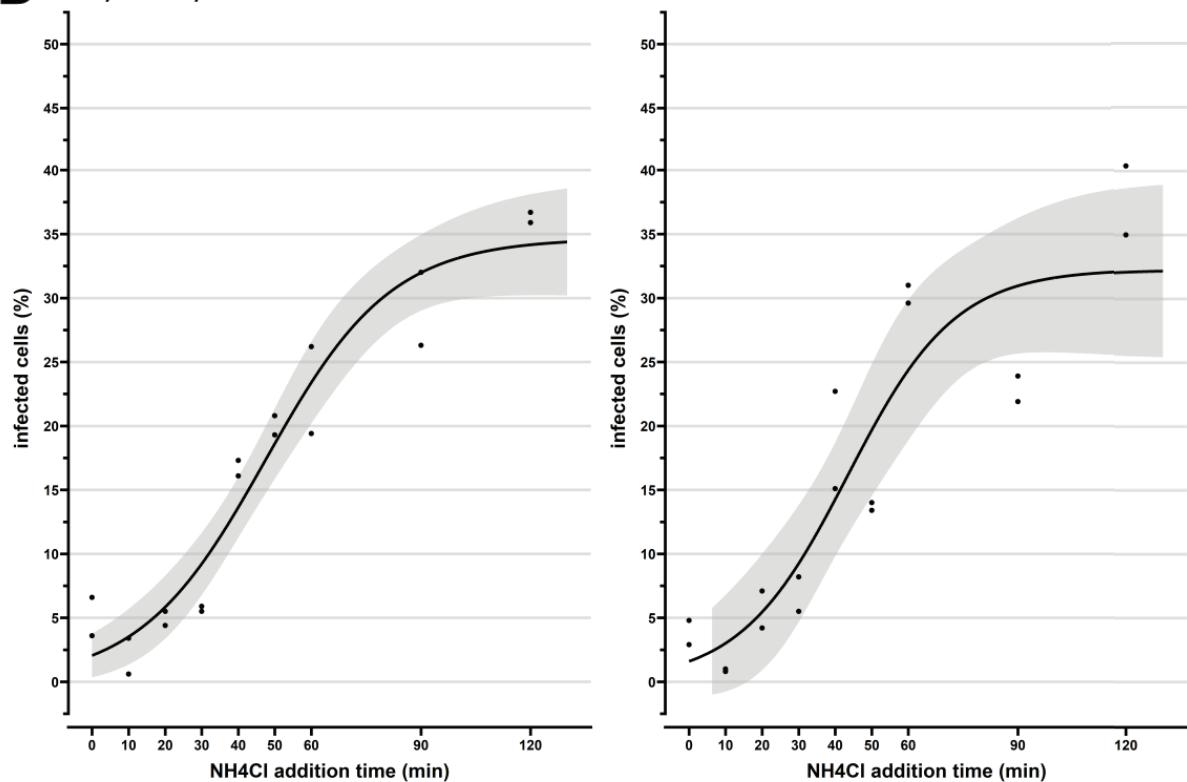
### K384 does not modulate the early stages of the viral infection

Our data showed that K384 residue located in Gn protein promotes the viral fitness of RVFV in the absence of an AUG0 in the 5'UTR of the segment M. This amino acid residue in position 384 is located at the surface of the B domain of Gn protein (Halldorsson *et al.* 2018b). Thus, we hypothesised that it could be involved in the attachment to the host cells and/or the cell entry of the virus. To determine the influence of this amino acid during the early stages of the virus cycle, we carried out virus binding assays in A549 cells infected with either rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384. As shown in the figure 39A, no difference between these two viruses was observed with a half-maximal level of cell attachment time of  $21.12^{+/- 4}$  min for rMRU25010-30 and  $21.8^{+/- 6}$  min for rMRU25010-30\_T384. Next, we performed virus entry assays to assess the time needed for these two viruses to complete the entry step meaning to escape the endosomal compartments and deliver their genome into cytoplasm of the infected cells. As shown in the figure 39B, we found that both viruses are internalized into A549 cells at the same rate, after a 20 min lag and with a half-maximal level of  $47.22 \text{ min}^{+/- 0.3}$  for rMRU25010-30 and  $47.72^{+/- 8}$  min for rMRU25010-30\_T384. Overall, these data showed that K384 does not affect the early stages of the RVFV viral cycle (i.e. virus binding or entry).

## A Binding assays



## B Entry assays

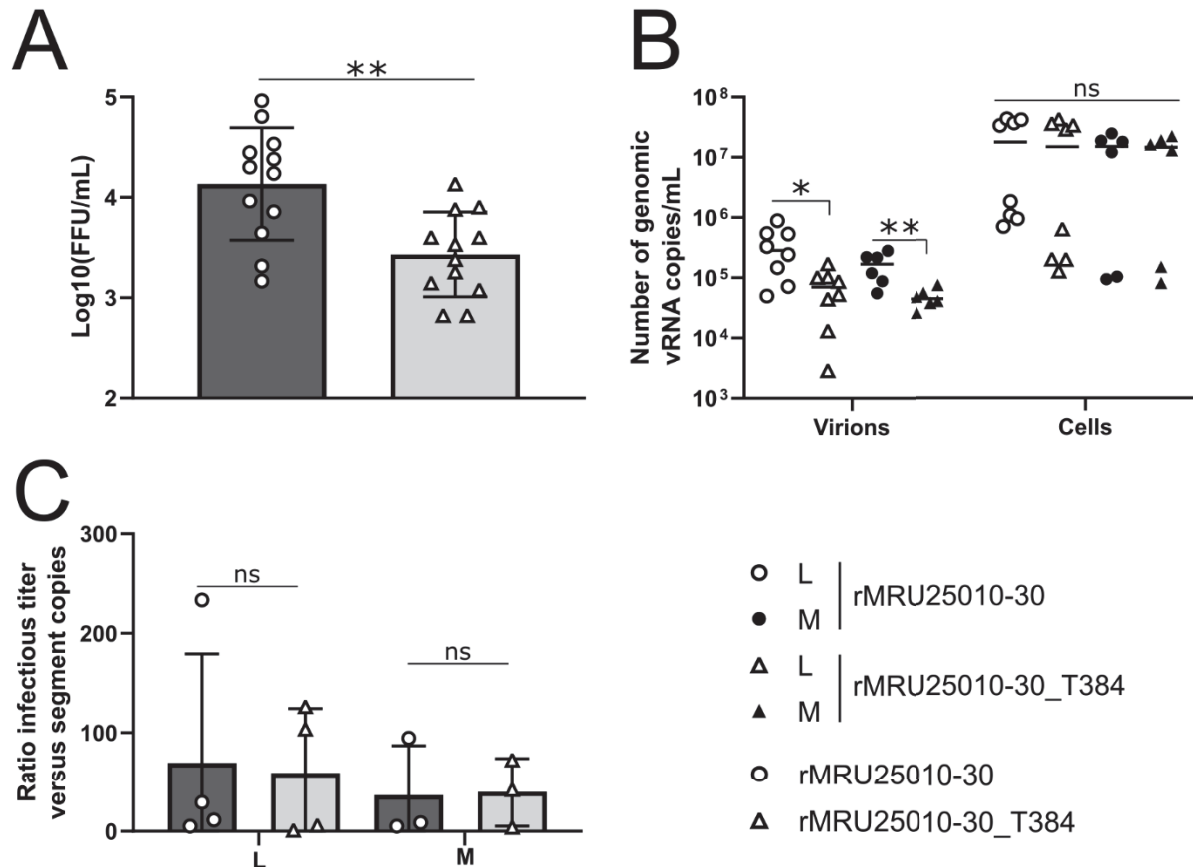


**Figure 39 : Effect of K384T mutation on the early steps of rMRU25010-30 replication cycle. (A)** *In vitro* virus binding assays ( $n=3$ , each biological replicate has been performed using independent virus stocks and each experiment were done in duplicate). A549 cells were placed on ice and allowed to interact with either rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384 (MOI=2) for the indicated time (0, 5, 10, 15, 30, 40 and 60 minutes). The inocula were then removed and the cells were carefully washed.

Fresh medium was then added, and the cells were incubated at 37°C for 2h to allow virus entry. Subsequently, the medium was replaced by medium containing 50 mM of NH<sub>4</sub>Cl to prevent any further viral entry (B) *In vitro* virus entry assays (n=2). A549 cells were placed on ice for 15 min prior to incubation, still on ice, with either rMRU25010-30 or rMRU25010-30\_T384 (MOI=2) for 1h. The inocula was then removed and the cells carefully washed before adding freshly prepared warm medium. At the indicated time points (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 and 120 min), the medium was again replaced by medium containing 50 mM of NH<sub>4</sub>Cl to block virus entry (n=2, each biological replicate has been performed using independent virus stocks and each experiment was performed in duplicate). For both assays (A and B), cells were further incubated at 37°C for 8h before being fixed with a 4% PFA solution, immunostained and analysed by FACS. Graphs correspond to one representative experiment. Half maximal level of attachment and entry times were calculated for each biological replicates by solving the logistic model equation (Cramer 2003).

### The nature of residue 384 impacts viral particles release.

The Gn protein is also involved in the later stages of the viral cycle by participating, together with Gc, to the viral particle budding at the Golgi membrane (Wu *et al.* 2017; Rusu *et al.* 2012; Carnec *et al.* 2014). Therefore, we evaluated, at the scale of one viral cycle, whether the nature of residue K384 could impact viral particles morphogenesis and release. To this end, we carried out a synchronised infection of A549 cells at MOI = 2 and determined the amount of viral infectious particles released in the supernatant at 8h p.i. We found that the infectious titres produced in rMRU25010-30 infected A549 cells is 3 time higher than those infected by rMRU25010-30\_T384 (p=0.0027) (Figure 40A). Moreover, the mean number of genomic viral RNA copies, for both L and M segments, are roughly five times higher in rMRU25010-30 virions fraction compared to rMRU25010-30\_T384 (p=0.0207 and p=0.0065 respectively) (Figure 40B). Altogether, the mean ratios number of copies of L or M segment versus infectious titres is comparable between rMRU25010-30 and rMRU25010-30\_T384 (Figure 40C), suggesting that these viruses did not display major intrinsic differences in incorporating their genomic segments into the newly formed viral particle, but it need to be confirmed by additional experiment. Additionally, in the cellular fraction, we did not observed difference in the amount of genomic viral RNA, suggesting that the level of replication is identical for these two viruses in these conditions. The previous binding and internalisation assays show no modification of those steps due to the mutation K384T and the start of the release process of viral infectious particles were observed between 7 and 8 hp.i. for the two viruses (data not shown). Overall, these data suggest that K384 residue is promoting the viral particle release.



**Figure 40 : Effect of K384T on the late steps of rMRU25010-30 replication cycle.** (A) A549 cells were infected at a MOI of 2 and cell supernatants were harvested at 8h p.i. Viral Infectious titers were subsequently determined by FFU assays and expressed as log<sub>10</sub> (FFU/mL). (B) Quantity of genomic segment L and M were measured by RT-qPCR in the cell supernatant (virions) and in the cellular fraction (cells) and expressed as number of genomic vRNA copies/mL. (C) Ratio of Infectious titer versus number of either L or M segment copies. All experiments were repeated at least three times independently and, each time in duplicate. The error bars represent standard deviations around the mean values (SEM). Wilcoxon-Mann-Whitney statistical analyses were performed, and significance is presented as follows:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), ns (non-significant).

## Discussion

In this study, we show that segment M is a key modulator of *in vitro* RVFV fitness. This can be correlated with the fact that sequence analyses highlighted that RVFV segment M displayed a greater substitution rate than the two other viral segments, although the genetic diversity observed for RVFV sequences compared to other viruses is low (i.e. approximately 95% nucleotide identity) (Bird *et al.* 2007; Freire *et al.* 2015). Notably, several reassortant RVFV strains have been identified in nature, some of them involving segment M (Grobbelaar *et al.* 2011; Liu *et al.* 2017; Maluleke *et al.* 2019; Bird *et al.* 2008, 2006-7). Interestingly, the vast majority of segment reassortants among bunyaviruses reported to date involved the interchange of the segment M of one virus with the segments L and S of another one, since the latter segments tend to reassort together (Briese *et al.* 2013; Kapuscinski *et al.* 2021). Thus, our data suggested that segment M reassortment between two RVFV strains circulating in the same geographical area like those in our study could profoundly affect the replication kinetic of the resulting virus and possibly its

pathogenicity as we previously show that the MRU25010-30 is much more virulent than MRU2687-3 in a mouse model.

One of the two key mutations we identified is a lysine (K) in position 384 of segment M (within Gn) that leads to much higher viral titers (from 10-100 times more) than those observed for the same virus but with a threonine at that position (i.e. rMRU25010-30\_T384). This residue is located at the surface of the domain B of Gn, which constitutes, together with domain A, the most apical part of RVFV Gn envelope protein (Halldorsson *et al.* 2018; Wu *et al.* 2017). Recently, it has been shown that RVFV entry is mediated by the interaction between Gn and the cellular receptor LRP1 and the domain B is known to be targeted by neutralising antibodies (Ganaie *et al.* 2021; Allen *et al.* 2018; Hao *et al.* 2020). Additionally, domain B is also acting as a shield of the Gc fusion loop and could therefore interfere with the stability of the viral particles and/or modulate the pH required for the structural rearrangement of Gc and the fusion step in endosomes (Halldorsson *et al.* 2018). Initially, we hypothesized that the K384 residue could impact the entry steps of RVFV. However, the data obtained from the virus binding and entry assays showed no significant difference between rMRU25010-30 and rMRU5010-30\_T384.

In order to study the effect of K384 on the late steps of the RVFV cycle, we infected A549 cells at a high MOI (i.e. 2) and found that, as soon as 8h p.i. rMRU25010-30 significantly produces more infectious viral particles than rMRU25010-30\_T384. This result suggests that K384 influences at least one of the later stages of the viral replication cycle. A general characteristic of bunyaviruses, and RVFV in particular, is that the formation and budding of the viral particles is taking place at the Golgi apparatus (Pettersson et Melin 1996). A previous study unveiled that Gn, through its cytosolic C-terminal tail (CT), plays an important role in the RNP packaging and the release of the viral particles and the folding of Gc (Carnec *et al.* 2014). This process is triggered by the accumulation of the Gn and Gc proteins in the Golgi apparatus. Gc has a retention motif in the ER and, by itself, it localises to this organelle. However, in the presence of Gn, the Gn/Gc heterodimer localises to the Golgi apparatus via a Golgi-retention motif located in CT of Gn (Gerrard et Nichol 2002; Matsuoka *et al.* 1988). It could be thus postulated that K384T mutation could be involved in Gn/Gn interaction. Indeed, the ring structure formed by the interaction between A and B domains of Gn/Gn dimers are known to be important to stabilise Gn/Gc shielding process and capsomer assembly (Halldorsson *et al.* 2018). Overall, K384T mutation could interfere in RVFV viral particle morphogenesis by modifying interactions of Gn with Gc or another molecule of Gn.

Using a Blast analysis, we identified only four RVFV strains harbouring K384 residue: ANK3837 (DQ380215.1), ANK6087 (DQ380216.1), M19\_ARBK\_SN\_BA\_1993 (JN995310.1) and M266\_ARBK\_SN\_BA\_1993 (JN995308.1); (data not shown). Remarkably, the first two have been isolated from bats in Guinea during the 1980's (Bird *et al.* 2007) and the two others from *Aedes vexans* mosquitoes in Barkedji area (Senegal) in 1993 (Soumaré *et al.* 2012), highlighting the circulation of other RVFV strains with K384 residue in West Africa.

Our study showed that the positive effect of K384 amino residue on *in vitro* viral replication depend on the genetic context and in particular that of the M segment. Indeed, this effect is completely abolished when an additional start codon, named AUG0, is present downstream AUG1 within the 5'UTR of the anti-genome. Notably, in the absence of this AUG0, K384 strongly promotes viral replication of the two RVFV strains which belong to two distinct genetic lineages (A versus E). Segment M sequences containing AUG0 have been already described for MP-12 vaccine strain, with a putative attenuation effect (Takehara *et al.* 1990; Takehara *et al.* 1989b). It is therefore possible that AUG0 is used by ribosomes to initiate the translation, leading to a very short polypeptide of 3 amino acids, but then competitively interfering with the translation efficiency of the M-segment proteins initiated by downstream AUG codons. This mechanism has been described in many organisms as well as in single-stranded RNA viruses such as Ebola virus (EBOV) (Calvo *et al.* 2009; Shabman *et al.* 2013). Interestingly, the Kozak context of AUG0 (5'-ACAAGAUGG-3') is considered as strong in mammals and is identical to that described for the strong upstream ORF (uORF) of EBOV (Shabman *et al.* 2013). Another possibility could be that C10U mutation is modifying the segment M panhandle secondary structure involving both 5' and 3' UTR of the viral RNA and known as a key regulator of the vRNA transcription by RdRp (Flick *et al.* 2002; Prehaud *et al.* 1997). In all these cases, either at the translational or transcriptional level, this would lead to a lower amount of Gn, suggesting that the effect of K384 amino acid residue is highly dependent on the amount of Gn produced. Further analyses with the C10U mutant viruses will shed some lights onto the impact of this mutation on late steps of the RVFV viral cycle.

In this study, we successfully developed reverse genetics system based on the consensus sequences of two RVFV field strains isolated from two distinct outbreaks that occurred in 2010 and 2013 in Mauritania (El Mamy *et al.* 2011; El Mamy *et al.* 2014; Sow *et al.* 2014). Thus far, only few RVFV strains have been investigated at such molecular level, including vaccine strain MP-12, as well as some virulent strains such as ZH548, ZH501 and more recently BJ01, Zinga and SA51 (Gerrard *et al.* 2007; Ikegami *et al.* 2006; Billecocq *et al.* 2008; Li *et al.* 2019; Ikegami *et al.* 2017). MRU2687-3 and ZH501/ZH548 belong to the lineage A while MRU25010-30 clusters with BJ01 in the lineage E for its M and L segments (Shi *et al.* 2017). Moreover, Zinga strain belongs to the lineage C and SA51 strain is the only member of the lineage G (Bird *et al.* 2007). Interestingly, further comparative characterization of the biological properties approaches between or within different genetic lineages could be carried out. This study also emphasizes the importance to generate high-quality sequences in order to not only generate consensus sequences but also assess the presence and the nature of viral subpopulations. Indeed, U10C and A1171C (K384T) mutations have been respectively identified within MRU2687-3 and MRU25010-30 strains as a population. It is clear that genome diversity greatly influences other viruses fitness and pathogenesis (Vignuzzi *et al.* 2006; Bifani *et al.* 2021), and further analysis of the virulence of rMRU25010-30, rMRU2687-3 and the related mutants, alone or mixed, would allow us to verify this hypothesis for RVFV.

In conclusion, this work led to the identification of two genetic markers within RVFV segment M that greatly influence its replication kinetics. This study provides



interesting bases for further understanding the role of Gn in the RVFV viral replication cycle as well as the mechanisms of regulation of viral M-segment protein expression. Finally, it also opens new perspectives for studying the impact of viral genetic diversity on RVFV virulence and eventually its vector transmission.

## Acknowledgements

We thank Dr. Lozach for his technical advices for the viral binding and entry assays. This work was supported by grants from INRA GISA metaprogramme 2017 named FORESEE. Mehdi Chabert is a PhD fellow co-financed by Animal Health Department of INRAe and CIRAD.

## Supplementary data

*Table S2 : Primers used in this study.*

Primer Name	Sequence 5' -> 3'	Usage
RT_RVFV_S	ACACAAAGCTCCCTAG	RT
RT_RVFV_M	ACACAAAGACCGGTG	RT
RT_RVFV_L	ACACAAAGACCGCCC	RT
FW_RVFV_S	ACACAAAGCTCCCTAGAGATACAAAC	Cloning PCR
RV_RVFV_S	ACACAAAGACCCCCTAGTGC	Cloning PCR
FW_pTVT7_RVFV_S	AGGGGGTCTTTGTGTGGGTCGGCATGGCATC TCCA	Cloning PCR
RV_pTVT7_RVFV_S	TAGGGAGCTTTGTGTCTATAGTGAGTCGTATT AATTTTCGCGGG	Cloning PCR
FW_RVFV_M	ACACAAAGACCGGTGCAACTTC	Cloning PCR
RV_RVFV_M	ACACAAAGACGGTGCATTAAATG	Cloning PCR
FW_pTVT7_RVFV_M	TGCACCGTCTTTGTGTGGGTCGGCATGGCATC TCCA	Cloning PCR
RV_pTVT7_RVFV_M	CACCGGTCTTTGTGTCTATAGTGAGTCGTATT AATTTTCGCGGG	Cloning PCR
FW_RVFV_L	ACACAAAGACCGCCCAATATTG	Cloning PCR
RV_RVFV_L	ACACAAAGGCGCCCAATCATG	Cloning PCR
FW_pTVT7_RVFV_L	TGGGCGCCTTTGTGTGGGTCGGCATGGCATCT CCA	Cloning PCR
RV_pTVT7_RVFV_L	GGGCGGTCTTTGTGTCTATAGTGAGTCGTATT AATTTTCGCGGG	Cloning PCR
Mut_Fw_AUG0	CGACTCACTATAGACACAAAGATGGTGCATTA AATGTATG	AUG0 mutagenesis
Mut_Rv_AUG0	CATACATTTAATGCACCATCTTTGTGTCTATAG TGAGTCG	AUG0 mutagenesis
Fw_MRU25010_mu t_K384	GGGGCAGTATAAAGGAAAATGGACTCTGGTC AGAC	Gn K384 mutagenesis

Rv_MRU25010_mut_K384	GTCTGACCAGAGTCCATTTTTCTTTATACTGC CCC	Gn K384 mutagenesis
Fw_MRU2687_mut_K384	AGGGGCAGTATAAAGGTAAAATGGACTCTGGT CAG	Gn K384 mutagenesis
Rv_MRU2687_mut_K384	CTGACCAGAGTCCATTTTACCTTTATACTGCCC CT	Gn K384 mutagenesis
Segment_S_Fw	CATTGCTAGAGTGGCAATCTG	Reverse genetic PCR control
Segment_S_Rv	ACACAAAGACCCCCTAGTGC	Reverse genetic PCR control
Segment_M_Fw	TTCCAGTCGTATGCTCATCATAG	Reverse genetic PCR control
Segment_M_Rv	TCCTCAGTCTTAAGGTCAAGC	Reverse genetic PCR control
Segment_L_Fw	GCATAAAGCAGACACTTTAGTGCA	Reverse genetic PCR control
Segment_L_Rv	ATCCCCAGCATCTATGTAGG	Reverse genetic PCR control
RVFL-2912fwdGG	TGAAAATTCCTGAGACACATGG	qPCR of L segment
RVFL-2981revAC	ACTTCCTTGCATCATCTGATG	qPCR of L segment
RVs	AAAGGAACAATGGACTCTGGTCA	qPCR of M segment
RVAs	CACTTCTTACTACCATGTCCTCCAAT	qPCR of M segment

Cette étude nous a permis d'identifier plusieurs déterminants viraux responsables des différences de phénotype observées entre les deux souches de RVFV isolées du terrain. Le développement du système de génétique inverse pour ces deux souches MRU25010-30 et MRU2687-3 nous a permis d'explorer l'impact de la diversité génétique intra- et inter-souches sur les propriétés virologiques du RVFV par des approches de réassortiment et de mutagenèse dirigée. Cette approche montre qu'il est possible de générer des virus réassortants fonctionnels. Dans notre étude, les virus réassortants générés ont présenté une cinétique de réplication similaire aux virus parentaux (i.e. MRU2687-3 ou MRU25010-30). Aucune dynamique de réplication intermédiaire *in vitro* n'a été observée. Les résultats de ces expériences montrent clairement que le segment M est le principal moteur des différences de dynamique de réplication de ces deux souches virales. En effet, en explorant la diversité génomique intra-souche, et plus particulièrement celle du segment M, nous avons pu mettre en évidence deux positions clés modulant profondément la cinétique de réplication virale. Il s'agit de la position 10 (U/C) localisée de la région non codante 5'UTR et la position 1171 (A/C) induisant un changement d'acide aminé (K/T) en position 384 de la protéine Gn. De plus, j'ai pu mettre en évidence une action dominante et antagoniste selon le nucléotide présent en position 10 sur l'effet promoteur de la réplication virale induit par la lysine (K) en position 384.

Ces résultats associés avec ceux présentés dans la partie 1 mettent en avant l'importance de l'identification de populations virales au sein d'une souche donnée. En effet, une infection initiale d'hôtes mammifères ou de vecteurs arthropodes avec une souche de RVFV contenant plusieurs sous-populations virales posent plusieurs questions clés sur la biologie de ce virus et qui restent, à ce jour sans réponse, telles que :

- i) Y a-t-il une sous-population virale qui prend le dessus sur une autre en termes de réplication et /ou de dissémination au cours de l'infection chez les mammifères ou les vecteurs ?
- ii) Y a-t-il une sélection et/ou une diversification de ces populations virales chez les hôtes mammifères et chez les vecteurs ?
- iii) Quelles sont les sous-populations retrouvées dans les différents organes infectés chez les mammifères (foie, cerveau, rate) ou dans les glandes salivaires, et en particulier la salive, chez les vecteurs ?

Toutes les réponses à ces questions permettraient de mieux comprendre les interactions entre le RVFV et ses hôtes/vecteurs afin d'évaluer l'effet de la diversité génétique sur la pathogénicité, la transmission vectorielle et de manière générale l'évolution génomique des souches circulantes de RVFV au cours des événements d'infection et de transmission.

## 5 Discussion

Les deux souches MRU2687-3 et MRU25010-30 ont subi un nombre minimum de passages en cellules VeroE6 avant d'être caractérisées au cours de mes travaux de thèse. Les pourcentages de différences entre ces 2 souches, en termes de nucléotides (pour les 3 segments S, M et L) sont très faibles, environ 5% (résultats, partie 1). La dynamique d'évolution des segments génétiques de RVFV a été décrite comme « lente » (Freire *et al.* 2015). Toutefois, on ne peut pas totalement exclure que les trois passages en cellules VeroE6 nécessaires à la production des stocks viraux n'ont pas eu un impact substantiel sur la séquence consensus ou le polymorphisme initial des souches par la sélection d'une ou plusieurs mutations déjà présentes ou apparues pendant l'amplification. Cependant, les résultats obtenus par la technique de RACE-PCR sur les extrémités 5' et 3' et les résultats obtenus par PCR conventionnel sur le reste du génome sur un passage plus précoce et sur différents stocks viraux ont toujours révélé les deux polymorphismes au niveau du segment M (anti-génome) (i) en position 10 des souches MRU2687-3 et ZH548 (U10C) et (ii) en position 1171 de la souche MRU25010-30 (induisant un changement d'acide aminé en position 384 (K384T)).

### 5.1 Mise en perspective des résultats avec les données épidémiologiques

Mes travaux de thèse ont consisté à caractériser les propriétés biologiques de deux souches isolées provenant de deux épisodes épidémiques distincts en Mauritanie. Un des résultats principaux est que la souche MRU25010-30 est plus virulente que la souche MRU2687-3 chez les souris BALB/c. Il est intéressant de noter que la première a été isolée à partir du sérum d'un dromadaire au cours de l'épidémie de 2010 pour laquelle il a été décrit, pour la première fois, des formes symptomatiques sévères dans cette espèce. Il est toujours difficile d'extrapoler des résultats obtenus en modèle murin avec ce qui est observé sur le terrain mais l'hyper-virulence de la MRU25010-30 corrèle avec sa capacité d'induire une forte morbidité ou mortalité chez les dromadaires. Un autre élément de réflexion provient des études ayant généré des séquences de RVFV au cours des épisodes épidémiques survenus en Afrique de l'Ouest. Lors de l'épidémie de 2012 qui a sévi en Mauritanie 34 cas humains ont été signalés incluant 17 décès. La séquence de RVFV obtenue dans la

région d'Assaba pendant cette période présente une proximité phylogénétique avec les souches de l'épidémie de 2010 telles que la souche MRU25010-30 (Lignée E selon la classification de « Bird ») alors que toutes les autres séquences issues d'animaux d'élevage ou de faune sauvage au nord du Sénégal et au sud de la Mauritanie appartiennent à la lignée A (Sow *et al.* 2014, 201; Jäckel *et al.* 2013; Bob *et al.* 2017). De plus, les séquences disponibles pour les épidémies de 2013-2014 (avec des cas d'infection chez l'Homme, les petits ruminants et les dromadaires), 2015 (31 personnes hospitalisées avec au moins 8 décès) et 2020 (78 cas humains confirmés et 219 cas d'animaux dont 94 dromadaires) sont, elles aussi, apparentées à la lignée A (Barry *et al.* 2022; Boushab *et al.* 2016; El Mamy *et al.* 2014). Cependant, nous ne disposons que de la séquence de la région du segment S codant la protéine NSs pour l'année 2020. Il est donc impossible de classer génétiquement les segments M et L et, ainsi tenter de faire un lien avec mes résultats. Notamment ceux démontrant avec le système de génétique inverse que l'échange des trois segments entre les souches MRU25010-30 et MRU2687-3 (issues de deux lignées différentes) était possible et que l'origine du segment M modulait les capacités répliquatives des virus réassortants. Dans les bases de données, plusieurs souches de RVFV ont été identifiées comme issues d'un réassortiment de segments, certaines impliquant le segment M (Bird *et al.* 2008; Maluleke *et al.* 2019; Liu *et al.* 2017). Au regard, d'une part, de la co-circulation des lignées A et E en 2012 dans une zone géographique « restreinte », et d'autre part, des multiples introductions en Afrique de l'Ouest de RVFV appartenant à différentes lignées génétiques, il est aussi possible que des phénomènes de réassortiment aient eu lieu (Soumaré *et al.* 2012). Il est certain que la mise en place systématique de campagnes de prélèvements (idéalement dans un processus de surveillance continue) est très lourde et coûteuse, d'autant plus si celle-ci implique un séquençage complet et/ou l'isolation des souches circulantes. Néanmoins, l'exemple récent de la pandémie de COVID-19 a clairement montré que le suivi des séquences génétiques du SARS-CoV2 permettait une meilleure évaluation des risques épidémiques et de virulences posées par les souches circulantes et participait ainsi à la prise de décision des autorités sanitaires et des pouvoirs publics (Aiewsakun *et al.* 2021 ; Korber *et al.* 2020). Une première question à la base de mes travaux de recherche est l'identification des déterminants viraux impliqués dans la pathogénicité et la transmission de RVFV, afin de cibler efficacement les

investigations. En ce sens, il est à noter que le segment S, contenant la séquence codant la protéine NSs qui est le principal facteur de virulence de RVFV, est sur-représenté dans les banques de données par rapport aux séquences des segments M et L. En revanche, il est dommage que le segment M ne soit pas plus étudié, ne serait-ce que parce qu'il est le segment présentant le plus de divergence de séquences au sein des souches de RVFV et qu'il code pour des protéines virales impliquées dans des étapes clés du cycle virale (entrée, morphogénèse de la particule virale, interactions virus-cellules) Les résultats obtenus au cours de ma thèse militent pour aller dans cette direction.

RVFV présente un large spectre de vecteurs potentiellement compétents parmi les espèces d'arthropodes (bien que les moustiques du genre *Aedes* et *Culex* soient décrits comme les principaux). Il peut également être transmis par contact direct avec des tissus ou des fluides contaminés (Reed *et al.* 2013, Hartman *et al.* 2014). Même si la souris est un modèle d'étude avec des avantages mais aussi ses limites, les données de virémie et de mortalité induites par les souches MRU25010-30 et MRU2687-3 dans ce modèle ont potentiellement des répercussions sur la capacité de ces deux souches à être transmises sur le terrain. En effet, nous savons que la dose virale initiale lors du repas de sang est un facteur important pour promouvoir l'infection du moustique (Turell *et al.* 2010; Turell *et al.* 1988; Seufi et Galal 2010; Turell *et al.* 2008; Drouin *et al.* 2022). J'ai pu observer, qu'au 3<sup>ème</sup> jour post-infection, la virémie circulante de la souche MRU25010-30 chez les souris infectées était plus forte que pour celles infectées par la souche MRU2687-3. Ceci pourrait corrélérer avec une meilleure capacité de transmission de la souche MRU25010-30 de l'animal au moustique. Ce phénomène pouvant néanmoins être contrebalancé par la mort plus rapide des animaux infectés par cette souche, réduisant ainsi la fenêtre de temps pendant laquelle l'animal virémique peut être piqué par un moustique. Afin de tester le potentiel de transmission des deux souches par leur vecteur, il serait intéressant de mettre en œuvre des expériences de compétence vectorielle chez le moustique en évaluant au cours du temps le taux d'infection (corps positifs), de dissémination (têtes positives) et de transmission (salives positives). Si des différences sont observées entre les deux souches, il sera alors intéressant d'identifier les déterminants viraux responsables de cette différence via les mêmes approches que celles que j'ai menées en système mammifère et grâce aux outils de

généétique inverse que j'ai mis en place. Le choix des espèces de moustiques vecteurs est important puisqu'il doit être représentatif des espèces de moustiques déjà décrites comme vectrices de RVFV et présentes sur le sol mauritanien. Des travaux de cette nature ont déjà été réalisés avec des souches ouest africaines circulant entre 1998 et 2003 chez *Ae vexans*, *Cx quinquefasciatus* et *Cx poicilipes*. Ces expériences ont montré des différences de taux d'infection et de transmission en fonction de la souche virale considérée (Ndiaye *et al.* 2016). D'autre part, des approches de modélisation combinant, entre autres, des paramètres de compétence vectorielle, de charge virale dans la salive des moustiques, de virémie et de temps de survie de l'hôte mammifère pourraient alors permettre d'évaluer le potentiel épidémique de chacune de ces souches (Cecilia *et al.* 2020; 2022).

Ce modèle pourrait aussi être complexifié en prenant en compte la possibilité des souches à être transmises par contact direct. Les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse constituent, en ce sens, un premier élément de réponse. En effet, nous avons pu montrer que les deux souches avaient la capacité d'être transmises par voie intranasale en modèle murin. Dans ces conditions, la mortalité induite par la souche MRU25010-30 est retardée par rapport à une inoculation sous-cutanée, tandis que nous n'avons pas observé cet effet pour la souche MRU2687-3. L'effet dose sur ce mode de transmission n'a cependant pas été testé et nous ne connaissons pas la quantité de virus potentiellement transmise par contact direct sur le terrain. Celle-ci est, quoiqu'il en soit, liée à la charge virale présente chez l'animal infecté. Il est important de noter que, lors de l'épidémie de 2010, la majorité des cas humains était en contact étroit avec les animaux et les dromadaires sont suspectés d'avoir joué un rôle central dans la transmission du virus (Faye *et al.* 2014; El Mamy *et al.* 2011).

Les résultats obtenus sur la virulence de ces souches ont ensuite été complétés par une approche *in vitro* dans différents modèles cellulaires. Ces derniers m'ont permis de mettre en évidence une différence de dynamique de réplication entre les souches qui corrèle avec les observations faites *in vivo*. J'ai donc fait le choix d'étudier les facteurs viraux responsables de cette différence de dynamique de réplication par des approches de génétique inverse. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse ont montré que deux mutations influencent considérablement les

propriétés biologiques de RVFV. Je vais, à présent, discuter plus précisément la représentativité et le rôle potentiel de ces deux marqueurs génétiques viraux.

## 5.2 La mutation C10U située à l'extrémité 5'UTR du segment M (anti-génome)

### 5.2.1 Analyse de la mutation C10U dans les séquences déposées de RVFV

La présence d'un AUG0 dû à la présence d'un uracile en position 10 de l'antigénome du segment M a été décrit la première fois chez la souche vaccinale MP12 (Takehara *et al.* 1990). L'identification de la population U10C pour la souche ZH548 étudiée lors de ma thèse pourrait donc laisser supposer que la présence de l'AUG0 dans la souche MP12 proviendrait de la souche ZH548 dont elle est issue. De façon intéressante, cette mutation n'est pas spécifique de ces deux souches car j'ai aussi détecté ce polymorphisme pour la souche MRU2687-3, alors que la souche MRU25010-30 contient invariablement une cytosine à cette position. De plus, deux autres souches (2008/00101 et 2008/00099), isolées à Mayotte lors de l'épidémie ayant eu lieu entre septembre 2007 et mai 2008, présentent elles aussi une uracile en position 10 (Cêtre-Sossah *et al.* 2012). Comme ces deux souches font partie de la lignée B (classification de Bird et collègues), cela suggère que cette mutation n'est pas spécifique d'une lignée génétique particulière. Comme discuté plus haut, les données épidémiologiques combinées à un séquençage systématique des souches de RVFV sont encore trop limitées pour tenter de corréliser la présence d'un uracile avec une possible différence de virulence. Cependant, la position de la mutation U10C au sein de l'extrémité 5'UTR du segment M permet d'approfondir notre réflexion sur la qualité des séquences à obtenir. En effet, le séquençage des souches circulantes utilise encore très souvent des approches de PCR conventionnel mettant en jeu des amorces qui masquent la séquence des extrémités du génome viral où se trouve cette mutation. En ce sens, mes travaux montrent que la technique de RACE-PCR est une bonne méthode pour obtenir la séquence des extrémités de chaque segment, en complément ou non d'une approche de séquençage profond, et qu'elle est suffisamment sensible pour détecter une population de séquences virales. Elle pourrait aussi être mobilisée de façon rétrospective pour étudier la séquence 5'UTR de l'anti-génome du segment des souches isolées au cours de différents épisodes



épidémiques ayant, par exemple, des caractéristiques de sévérité notablement différentes.

### 5.2.2 La mutation U10C pourrait impacter le métabolisme de l'ARN du segment M

J'ai pu montrer que la nature du résidu nucléotidique en position 10 de l'antigénome du segment M influait légèrement la production de particules infectieuses en cellules A549 pour les virus rMRU2687-3 et rMRU25010-30\_T384. Cependant, cet effet est potentialisé dans les virus rMRU2687-3\_K384 et rMRU25010-30 où la présence d'un uracile diminue fortement la réplication virale. En complément de ces résultats, j'ai pu tester l'impact de cette mutation dans le fond génétique de la ZH548, contenant notamment une thréonine en position 384 de la polyprotéine du segment M (Figure 41). Dans ce contexte, j'ai de nouveau pu observer un rôle modulateur de cette position. A 48h post-infection, le virus ayant une cytosine en position 10 (rZH548\_aCg) présente un titre infectieux significativement plus fort que la souche d'origine ou le virus ayant uracile (rZH548-aUg).

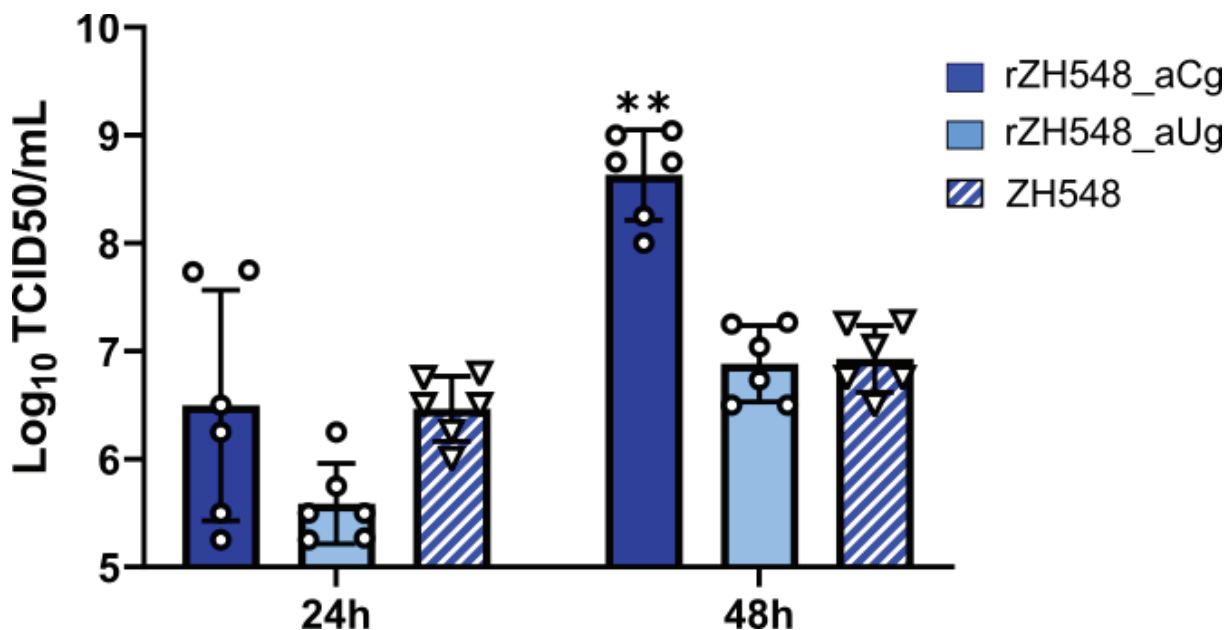


Figure 41 : Courbe de croissance des souches ZH548 « wild type » et celles générées par génétique inverse. Les cellules A549 ont été infectées avec les souches ZH548 ou rZH548 ou rZH548\_aUg à une MOI de 0.01, les titres infectieux dans le surnageant ont été mesurés par la méthode TCID<sub>50</sub>. La comparaison statistique des titres a été réalisée par la méthode de Kruskal-Wallis, \* ( $p < 0.05$ ) ; \*\* ( $p < 0.01$ ).

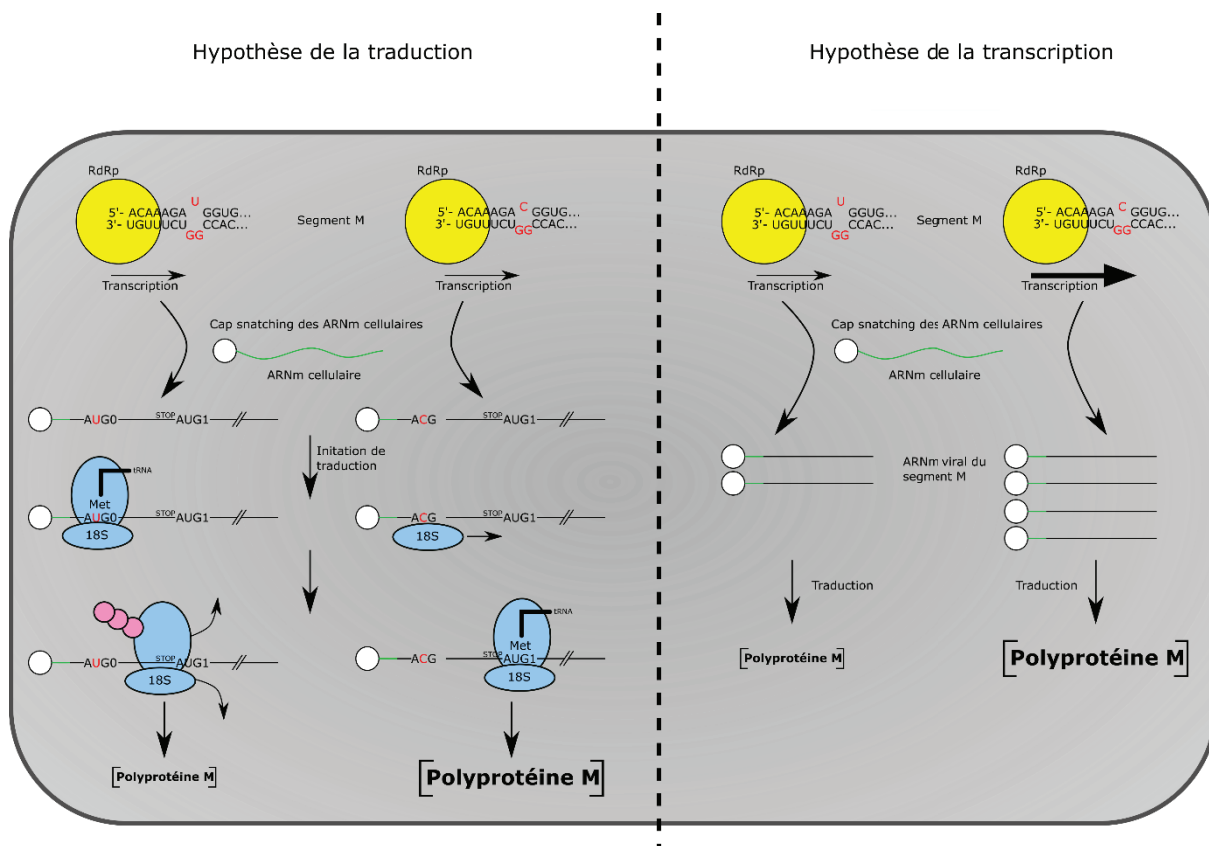
La nature du nucléotide à cette position pourrait impacter le métabolisme du segment M de différentes manières. La première hypothèse serait qu'elle régule la traduction des protéines du segment M. En effet, un uracile en position 10 induit la présence d'un nouveau codon d'initiation de traduction AUG, nommé AUG0. Celui-ci

se trouve en amont des autres codons d'initiation connus pour le segment M de RVFV (AUG1 à 5). Cela n'est pas sans rappeler les « upstream ORF » (uORF) qui sont des codons d'initiation situés dans la région 5'UTR d'un ARN messager et en amont du codon d'initiation d'un gène. Ces uORFs sont connus pour jouer un rôle dans la régulation de la traduction de gènes. Ce mécanisme a été décrit dans de nombreux organismes ainsi que chez des virus à ARN simple brin comme le virus Ebola (EBOV) (Calvo *et al.* 2009; Shabman *et al.* 2013). Pour exercer ce rôle de régulation, ce codon nécessite un contexte de Kozak favorable à la traduction mais aussi une distance suffisante avec le 5'-Cap pour permettre sa reconnaissance par le complexe d'initiation de la traduction (Calvo, Pagliarini, et Mootha 2009). Ce mécanisme existe aussi chez le virus Bunyamwera (BUNV, ordre *Bunyavirales*) où la présence de l'uORF en amont du codon d'initiation de la protéine L impacte la traduction de cette dernière (Lowen *et al.* 2005). Dans le contexte de RVFV, la mutation U10 est très proche de l'extrémité 5' de l'antigénome et il est possible que l'AUG0 soit positionné trop en amont pour être utilisé par le complexe d'initiation de la traduction (Jackson *et al.* 2010). Toutefois, la transcription des ARN messagers viraux par la protéine L de plusieurs virus de la famille *Bunyavirales* nécessite la présence d'une amorce qui est apportée par le mécanisme de cap-snatching (Klemm *et al.* 2013). La RdRp du virus Influenza, qui possède la même activité, ajoute ainsi une vingtaine de nucléotides en amont de la séquence virale (Decroly *et al.* 2011; Chen *et al.* 2021). Cela rallonge donc la taille de la région d'hybridation possible du complexe d'initiation de la traduction et donc la reconnaissance de l'AUG0 par le complexe 18S du ribosome (Jackson *et al.* 2010). De plus, le contexte Kozak de l'AUG0 (5'-ACAAAGAUGG-3') est considéré comme fort chez les mammifères et est identique à celui décrit pour l'uORF fort d'EBOV (Shabman *et al.* 2013). L'initiation de la traduction à partir de l'AUG0 permet la synthèse d'un peptide de 3 acides aminés (aa) du fait de la présence d'un codon stop, TAA, situé directement en 3' du codon AUG1 (Figure 42). La reconnaissance de l'AUG0 par le complexe d'initiation de traduction pourrait donc par un phénomène de titration diminuer la traduction des protéines du segment M initiée à partir des autres AUG situés en aval.

La deuxième hypothèse consiste en un impact sur la transcription du segment M. En effet, il a été montré que la structure en manche de casserole (« panhandle », en anglais), impliquant l'interaction entre les extrémités 5' et 3' UTR jouait un rôle

dans l'activité transcriptionnelle du virus Uukuniemi (UUKV) (Flick *et al.* 2002). Comme décrit dans l'introduction du manuscrit, l'association des deux extrémités forme une tige sur une longueur de 15 nt. Cette tige présente une boucle interne en position 10 (de l'anti-génome) due à un mésappariement des bases et cette structure secondaire de l'ARN est observable pour les trois segments génétiques. La formation d'un mésappariement de plus grande taille dans cette région pourrait donc diminuer l'efficacité de transcription du génome viral (Figure 42). En effet, Flick et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'une boucle interne de grande taille est défavorable à la transcription de l'ARN chez UUKV, la réciproque a aussi pu être démontrée puisqu'une réduction de la taille de cette boucle interne augmente l'activité transcriptionnelle (Flick *et al.* 2002). De façon intéressante, la prédiction de la structure secondaire de l'ARN du segment M en présence d'une cytosine en position 10 a pour effet de réduire la taille de la boucle interne. Cette observation a pu être réalisée sur les 3 souches utilisées pendant mes travaux de thèse (données non montrées). La présence de l'uracile pourrait donc avoir un effet délétère sur la transcription du segment M réduisant ainsi la quantité de protéines virales produites et notamment les protéines Gn/Gc pour la formation de nouvelles particules virales infectieuses.

Il est bien sûr possible que l'effet de la mutation C10U observé *in vitro* sur la réplication virale en cellules A549 soit dû à la combinaison d'une dérégulation de la transcription et de la traduction du segment M. La technique dite Ribosome profiling (ou Ribo-Seq), combiné à une analyse RNA-seq, devrait permettre de tester chacune de ces hypothèses (Schneider-Poetsch *et al.* 2010; Machkovech *et al.* 2019). En effet, cette méthode permettrait de déterminer : (i) les sites d'initiation de la traduction dans le segment M ainsi que ceux des deux autres segments de RVFV et (ii) l'efficacité de la traduction de chacune des protéines virales. L'analyse en parallèle par RNA-seq permettrait, quant à elle, de déterminer la quantité des ARN messagers viraux produits.



**Figure 42** : Mécanismes d'actions possibles de la mutation C10U dans l'extrémité 5'UTR du segment M (anti-génome). Il est possible que la mutation C10U module l'activité traductionnelle (à gauche) et/ou transcriptionnelle (à droite) de ce segment. L'hypothèse de traduction repose sur la présence de l'AUG0 qui pourrait être reconnue par la sous unité 18S du ribosome et initier la traduction d'un peptide de 3 aa, réduisant ainsi l'utilisation des autres codons d'initiation de la traduction connus pour le segment M (seul AUG1 est représenté sur ce schéma). L'hypothèse de la transcription propose que la mutation C10U interfère avec la taille du mésappariement situé dans la structure « panhandle » qui régule la quantité d'ARNm viraux produits par la protéine M.

### 5.3 La mutation K384T située dans la glycoprotéine virale Gn

#### 5.3.1 Analyse de la mutation K384T dans les séquences de RVFV disponibles dans les banques de données

L'autre déterminant viral identifié au cours de mes travaux de thèse est le résidu acide aminé en position 384 de la polyprotéine du segment M. Ce résidu se trouve dans la glycoprotéine d'enveloppe Gn et, plus précisément, dans une boucle de la région structurée appelée domaine B (Halldorsson *et al.* 2018b). Le résidu T384 est le plus répandu parmi les séquences déposées (partielles et complètes). En dehors de la souche MRU25010-30, seules quatre séquences présentent une lysine à cette position (K384) et correspondent aux souches ANK-3837, ANK-6087, M19\_ARBK\_SN\_BA\_1993 et M266\_ARBK\_SN\_BA\_1993. Il s'avère que ces quatre souches proviennent d'Afrique de l'Ouest. Les deux premières ont été isolées de

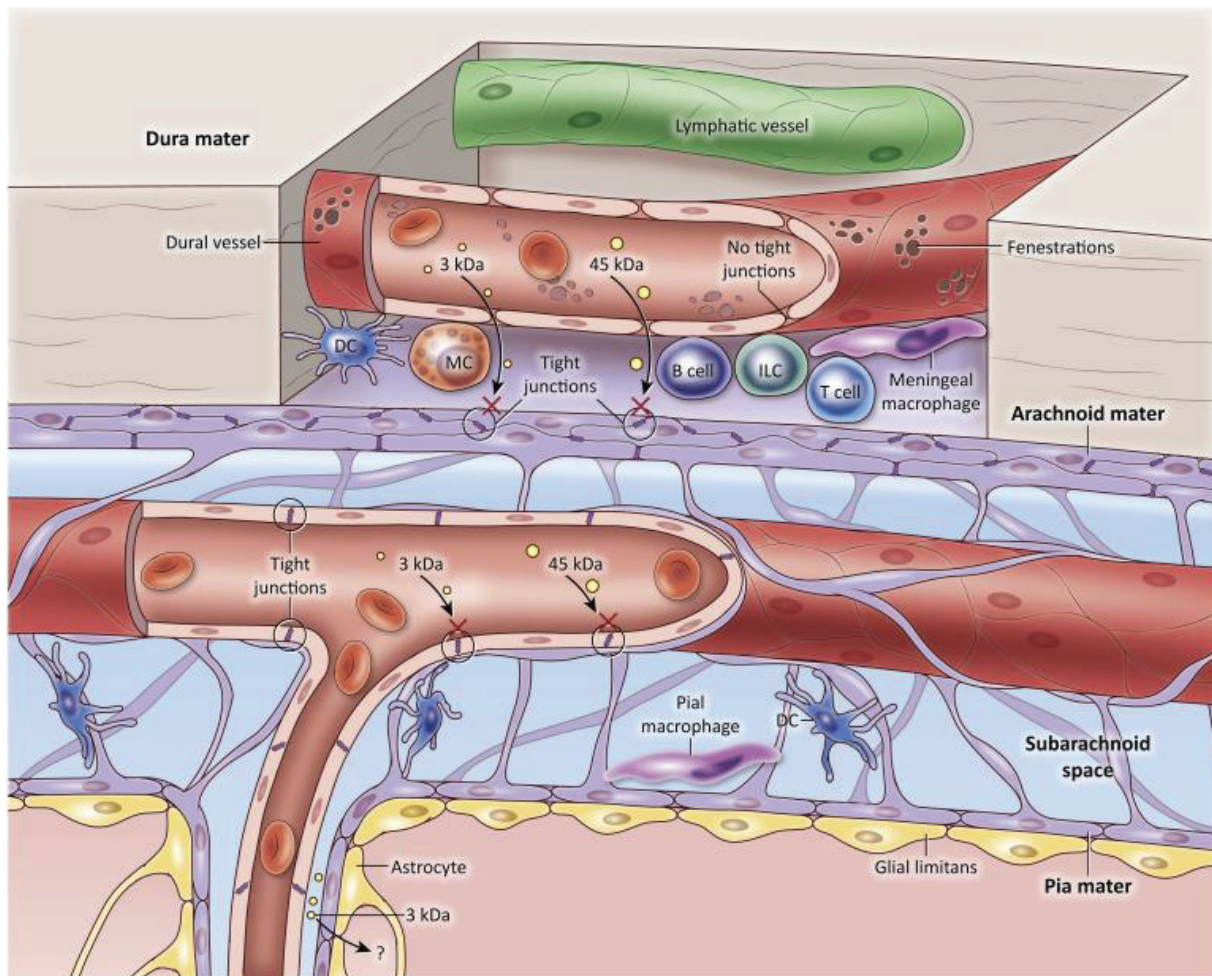
chauves-souris au Burkina Faso alors que les deux autres proviennent d'*Ae vexans* dans la région de Barkedji au Sénégal en 1993 (Bird *et al.* 2007; Soumaré *et al.* 2012). Toutefois, ces souches sont, par ailleurs, relativement divergente : ANK (lignée C), M19/226 (lignée inconnue) et MRU25010-30 (lignée E) (Rey *et al.* 2019; 2018; Bird *et al.* 2007).

### 5.3.2 Implications fonctionnelles de la mutation K384T sur les protéines Gn et p78

Les résultats obtenus en cellules A549 montrent que la nature du résidu 384 de la protéine Gn n'impacte pas l'infectivité intrinsèque des particules virales. En effet, le temps médian d'attachement et d'entrée des virus rMRU25010-30 et rMRU25010-30\_T384 sont comparables. Nous avons mesuré un temps moyen d'entrée de 47 min pour les deux virus testés ce qui correspond à environ 20 minutes de plus que ce qui est décrit dans la littérature pour RVFV (Koch *et al.* 2021; de Boer *et al.* 2012a). Cela pourrait être dû à la différence d'inertie thermique entre l'eau et l'air au cours des expérimentations. Néanmoins, nous avons analysé l'effet de ce résidu dans les mêmes conditions expérimentales et, même si un nivellement entre les deux souches est toujours possible dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé de différences en termes d'infectivité. Le résultat principal de ces expériences étant que les deux virus fusionnent dans le même type de compartiment cellulaire, c'est-à-dire l'endosome tardif (Koch *et al.* 2021). On ne peut cependant pas exclure que la mutation K384T ait une influence sur ces deux étapes du cycle viral dans d'autres types cellulaires chez les mammifères ou bien chez l'insecte, en modifiant l'affinité de Gn pour des récepteurs ou facteurs d'adhésions cellulaires peu ou pas exprimés par les cellules A549 (Ganaie *et al.* 2021a; Lozach *et al.* 2011a; Léger *et al.* 2016b; de Boer *et al.* 2012a). En effet, la protéine Lrp1 ou les héparanes sulfate sont bien exprimés dans cette lignée cellulaire mais les protéines L-sign et DC-sign n'y sont pas synthétisées. Il serait donc intéressant d'élargir ces approches à d'autres types cellulaires comme des hépatocytes (HepaRG) ou encore des lignées de cellules de l'immunité innée comme les macrophages RAW264.7 ainsi que les cellules dendritiques murines DC2.4 dans lesquelles le virus pourrait avoir un comportement d'attachement et d'entrée différent. En effet, un attachement ou une entrée plus efficace médiée par la protéine Gn portant le résidu K384 pourrait avoir une incidence importante sur la dynamique d'infection dans ces types cellulaires.

De façon intéressante, durant la caractérisation *in vivo* des souches de terrain, nous avons observé une invasion précoce du cerveau des souris infectées par la souche MRU25010-30 (D2-D3), par la voie SC, alors que nous ne détectons la souche MRU2687-3 dans cet organe qu'à partir du jour 6. Le cerveau est protégé par deux barrières riches en cellules immunitaires. Tout d'abord, la barrière hématoencéphalique (BHE) qui est la zone d'interaction entre les vaisseaux sanguins et la matière araignée. Cette barrière est riche en astrocytes, en cellules dendritiques, en leucocytes et en macrophages piales (Figure 43). La seconde barrière est la barrière méningée qui est située dans la dure-mère au-dessus de la matière araignée (Figure 43). Les vaisseaux sanguins de ce compartiment présentent une porosité plus importante que ceux de la BHE et sont entourés par une large population de cellules immunitaires (Rua et McGavern 2018). De façon intéressante, les cellules immunitaires précédemment citées ont une étroite communication avec la BHE leur permettant de la traverser sans induire la rupture de cette dernière. Ces mouvements sont très souvent induits durant l'inflammation du cortex (Rua et McGavern 2018; Marchetti et Engelhardt 2020; Warrington *et al.* 2022). Il a été proposé pour le WNV et d'autres virus neurotropes tels que le virus de la Chorioméningite lymphocytaire (LCMV), que l'infection des macrophages piales ou des cellules dendritiques dans la matière araignée du cerveau pourrait permettre la neuro-invasion (Bai *et al.* 2010; Rua *et al.* 2019; Cain *et al.* 2019; Kang et McGavern 2008). Le RVFV est connu pour se répliquer dans ces différents types cellulaires (Rua et McGavern 2018; McElroy et Nichol 2012; Grolla *et al.* 2012; Terasaki *et al.* 2021). Ces cellules pourraient donc servir de sièges de la réplication virale pour l'invasion du cerveau et permettre son passage à travers la BHE (Albe *et al.* 2019). Le résidu K384 de la souche MRU25010-30 pourrait permettre une infection plus efficace de ces types cellulaires situés à la périphérie du cortex et donc un passage plus précoce de la BHE pour atteindre le cortex. Dans cette hypothèse, les deux autres souches MRU2687-3 et ZH548 semblent devoir attendre la perméabilisation de la BHE avant de pouvoir atteindre le système nerveux central (Walters *et al.* 2019). Ce phénomène survient autour des 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jour chez les souris infectées par WNV et est médié par une concentration anormalement élevée de TNF- $\alpha$  (T. Wang *et al.* 2005). Ce mécanisme pourrait donc faciliter la dissémination plus tardive des souches MRU2687-3 et ZH548 au cortex. D'un autre côté, la souche MRU25010-30 présente

une forte dynamique de réplication quel que soit le modèle cellulaire testé. Cette forte dynamique pourrait donc induire une réponse élevée en TNF- $\alpha$  au voisinage de la BHE et ainsi induire sa perméabilisation plus précoce qu'avec les deux autres souches. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer les cytokines pro et anti inflammatoires circulantes à différents temps de l'infection en modèle murin. Une autre hypothèse peut être émise au regard des dynamiques de réplication observées dans le modèle des hiPSC différenciées en cellules neurales. En effet, il est possible que les trois souches étudiées entrent avec la même cinétique dans le cerveau, mais que le niveau de réplication des souches MRU2687-3 et ZH548 soit trop faible pour être détecté par RT-qPCR. Quoiqu'il en soit, nous pourrions tester l'ensemble de ces hypothèses (ainsi que l'impact de la diversité intra-souche sur la virulence), en (1) infectant des souris BALB/c avec soit rMRU25010-30\_K384 soit rMRU25010-30\_T384 et (2) en testant en parallèle l'influence de la mutation K384T en comparant les capacités répliquatives de ces deux virus en hiPSC différenciées en cellules neurales.



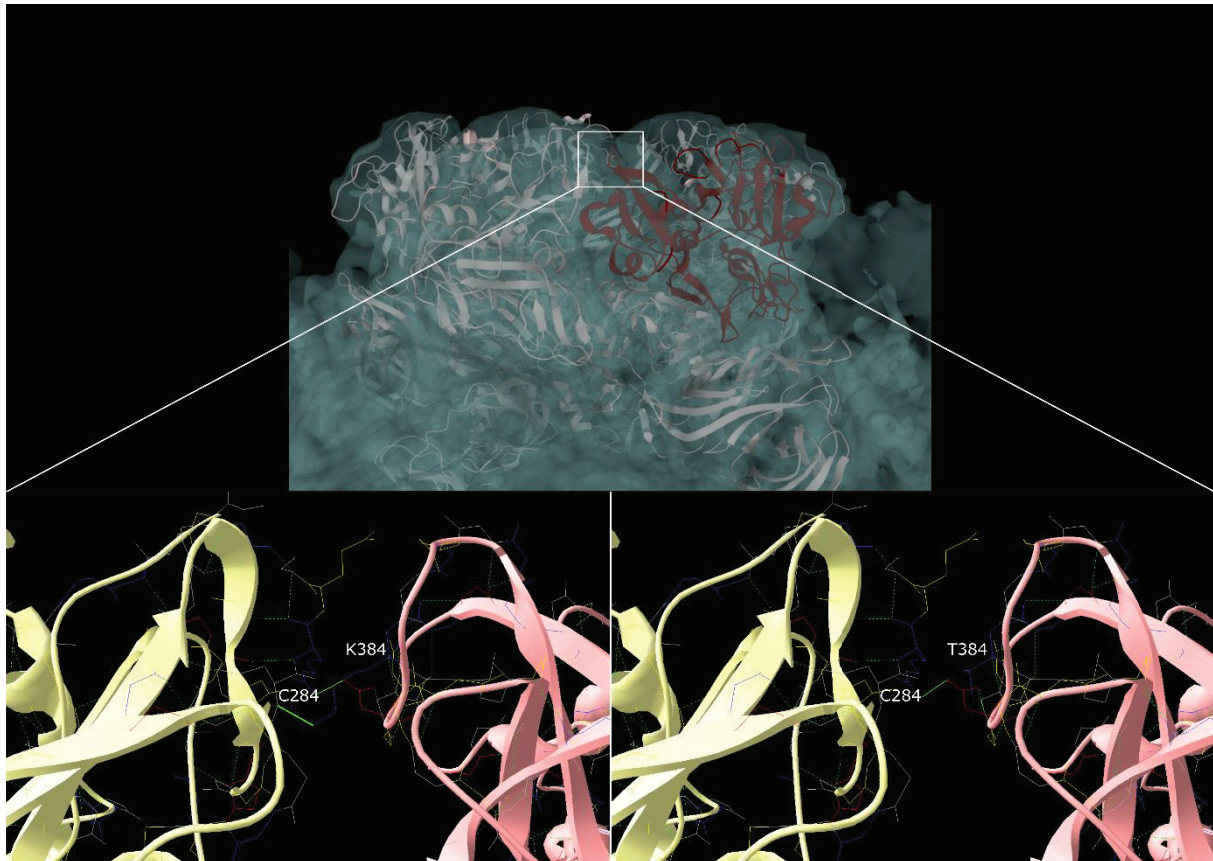
Trends in Molecular Medicine

**Figure 43 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique à l'interface entre le cortex et la dure-mère.** La dure-mère contient les vaisseaux durs et les différentes populations de cellules immunitaires de la dure-mère (Rua et McGavern 2018).

N'ayant pas observé d'effet du résidu 384 sur les phases précoces du cycle viral, nous avons décidé d'explorer un possible rôle du résidu K384 dans les étapes tardives du cycle de réplication viral. Pour cela, j'ai infecté les cellules A549 à un MOI élevé et effectué mes analyses à un temps précoce (8 h p.i.) correspondant à un seul cycle de réplication du virus. J'ai pu montrer, dans ces conditions, que le résidu K384 permettait aussi la production d'un titre infectieux plus élevé et que le nombre de particules virales infectieuses par génome (environ 1 pour 60) était très comparable pour les virus rMRU25010-30 (K384) et rMRU25020-30\_T384. Ces données suggèrent que la mutation T384K facilite la production de particules infectieuses sans altérer (positivement ou négativement) la qualité des particules virales. Un phénotype similaire a été décrit pour la mutation D614G dans la protéine spike du SARS-CoV 2 (Korber *et al.* 2020). La souche mutante G614 est capable de produire un plus grand nombre de particules infectieuses avec également une quantité d'ARN plus



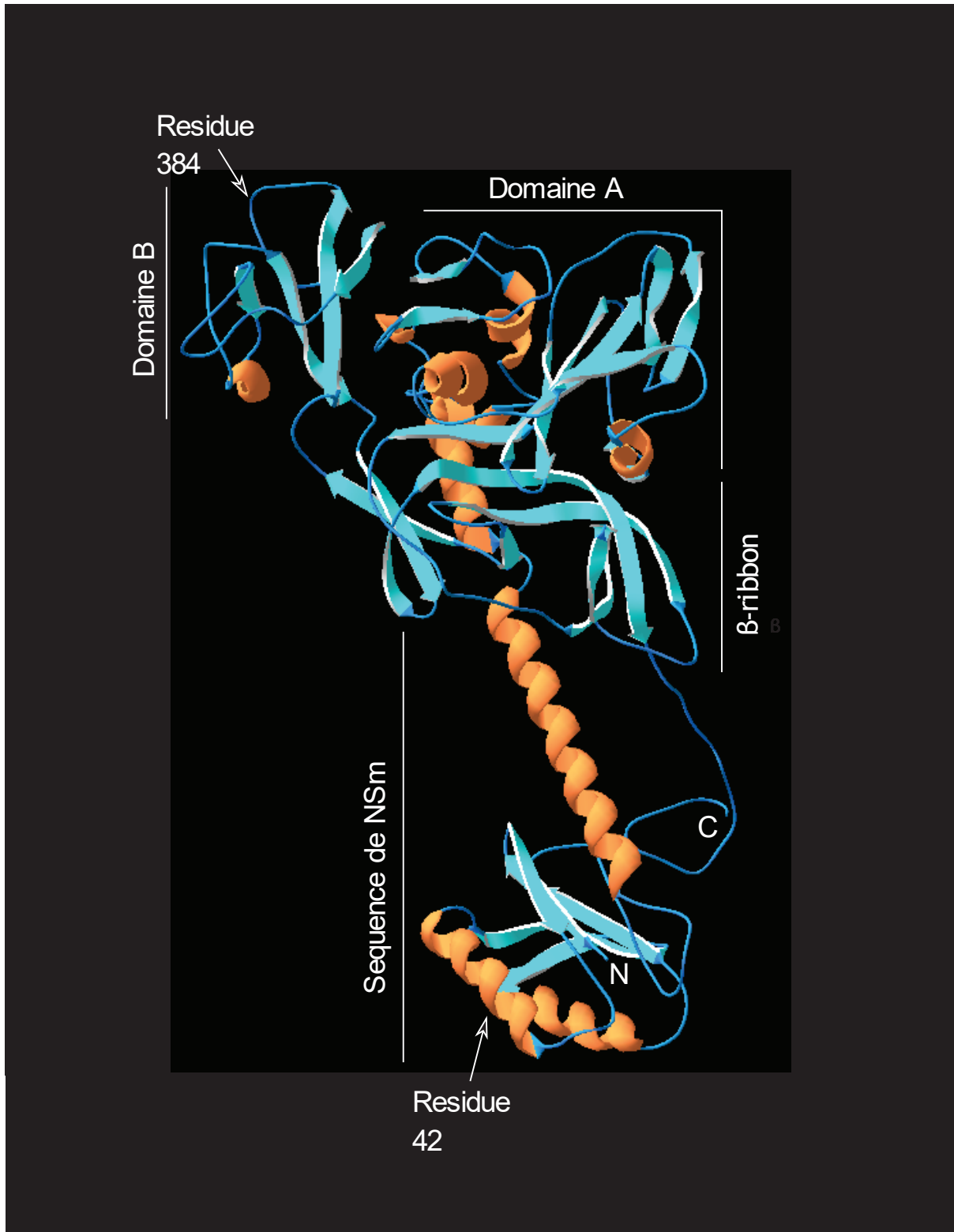
importante dans le surnageant des cellules infectées sans toutefois que cette mutation impacte les processus d'attachement, d'entrée ou de clivage de la protéine Spike. Cette mutation est située dans un domaine impliqué dans les interactions entre les protéines spike pour former le trimer situé à la surface de la particule virale (Korber *et al.* 2020; Wrapp *et al.* 2020; Walls *et al.* 2020). De façon intéressante, la boucle du domaine B de la protéine Gn portant le résidu 384 est située en face du domaine A d'une autre chaîne de Gn dans le capsomère (Halldorsson *et al.* 2018b; Hulswit *et al.* 2021). Ainsi, les boucles des domaines A et B des protéines Gn interagissent et stabilisent la structure en cercle du capsomère (figure 44). Une stabilité accrue des interactions Gn/Gn pourrait ainsi accélérer le processus de formation des particules virales comme cela a été décrit pour d'autres virus comme HBV (Bahadur *et al.* 2007; Katen et Zlotnick 2009). Je propose l'hypothèse que le résidu K384 favorise les interactions entre les chaînes de Gn du capsomère et ainsi une dynamique plus rapide de formation de nouvelles particules virales. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé une prédiction de la structure tertiaire de la protéine Gn avec les deux types de résidu 384 à l'aide de l'algorithme RoseTTAfold (Baek *et al.* 2021; Hiranuma *et al.* 2020). Ces modèles de structure ont été par la suite confrontés aux structures résolues par cristallographie au rayon X ou obtenues par Cryo-EM. La conformation prédite par l'algorithme est extrêmement similaire à celle résolue par des méthodes expérimentales (Halldorsson *et al.* 2018b). Cette méthode met en évidence les régions d'interface entre les chaînes de protéines Gn, et plus particulièrement les différences d'interaction des résidus K384 et T384 avec la seconde chaîne de Gn (figure 44). En effet, contrairement au résidu T384, le résidu K384 semble pouvoir permettre la formation d'une liaison hydrogène avec la fonction acide carboxylique du résidu C284 (en vert). Afin d'aller plus loin sur cette hypothèse, nous pourrions créer une série de mutants permettant d'abolir puis compenser l'interaction entre les deux résidus en position 284 et 384, et tester l'impact de ces mutations sur la production de particules virales infectieuses.



**Figure 44 : Structure du capsomère et interactions entre les domaines A et B de Gn en fonction du résidu 384.** Les deux chaînes de Gn sont représentées en jaune pâle et rouge pâle. La charge des acides aminés est représentée par leur couleur : bleu (positive), rouge (négative), jaune (polaire) et blanc (apolaire). Le lien hydrogène est représenté par un trait vert.

La protéine p78 contient aussi le domaine Gn est par conséquent sa fonction pourrait elle aussi être impactée par la mutation K384T sans que nous puissions l'exclure à travers nos résultats. p78 est nécessaire à la dissémination de RVFV chez le moustique et est incorporée à la surface des particules virales produites en cellules d'insecte (Kreher *et al.* 2014; Weingartl *et al.* 2014). D'autre part, Terasaki et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'une souche ZH548 surexprimant p78 présentait une capacité de répllication réduite dans les macrophages RAW264.7 et une atténuation de virulence en souris CD-1 (Terasaki *et al.* 2021). La structure de p78 n'est pas publiée, nous ne pouvons donc pas nous appuyer sur une structure déjà résolue. J'ai donc utilisé la même méthode de prédiction de structure décrite plus haut pour Gn afin d'étudier la position du résidu 384 dans la structure de cette protéine (figure 45). La prédiction de la structure de p78 est particulièrement intéressante puisqu'elle conserve les mêmes domaines A, B et  $\beta$ -ribbon décrit pour Gn tout en y associant la séquence correspondant à la protéine NSm (Rusu *et al.* 2012). Le domaine C-terminal de NSm, structuré en hélice alpha, est positionné à

l'emplacement où Gc interagit avec le domaine  $\beta$ -ribbon de Gn (Figure 45) (Terasaki *et al.* 2013; Halldorsson *et al.* 2018b). Au regard de l'homologie de structure entre Gn et p78, la mutation du résidu 384 pourrait impacter de manière similaire ces deux protéines.



**Figure 45 : Prédiction de la structure de la protéine p-78.** La modélisation de la protéine p-78 a été réalisée à l'aide de l'algorithme RoseTTAfold (Baek et al. 2021; Hiranuma et al. 2020), les 16 premiers acides aminés (signal peptide) et la fraction intra cytoplasmique de la protéine Gn ont été soustraits pour améliorer la lisibilité de la structure obtenue (Spiegel, Plegge, et Pöhlmann 2016). Les domaines correspondant à la protéine NSm ont été annotés à partir de la séquence primaire et les domaines correspondant à Gn à partir des travaux de Halldorsson et collaborateurs (Halldorsson et al. 2018b). La position des résidus 42 et 384 est indiquée sur la figure.

Comme je l'ai écrit précédemment, il a été montré que p78 est essentielle à la dissémination de RVFV chez le moustique (Kreher *et al.* 2014). De plus, un virus n'exprimant pas p78 se réplique *in vitro* beaucoup moins efficacement en cellules de moustiques C6/36 en comparaison d'un virus sauvage. Par conséquent, K384 peut aussi avoir un effet significatif chez l'insecte que ce soit au niveau de Gn et/ou de p78. Il serait donc intéressant de tester la réplication des virus rMRU25010-30 (K384) et rMRU25010-30\_T384 dans ce type cellulaire. Parallèlement, il sera aussi important d'étudier l'effet de la mutation C10U dans ces cellules, en comparant la cinétique de réplication des virus rMRU2687-3 et rMRU2687-3\_aCg ainsi que rZH548 et rZH548\_aUg. Les résultats de ces expériences pourront ensuite être complétés par des expériences *in vivo* de compétence vectorielle chez le moustique.

Nous avons précédemment discuté de l'impact et des mécanismes potentiellement modifiés par les deux résidus indépendamment l'un de l'autre. Toutefois, comme j'ai pu le montrer dans la seconde partie des résultats, la présence d'un uracile en position 10 du 5'UTR abolit le gain de réplication médié par le résidu K384 et ce quel que soit le contexte génétique. La diminution de la transcription et/ou de la traduction du segment M due à l'uracile 10 diminuerait la quantité de protéine Gn produite. Cela suggérerait que l'effet de K384 dans Gn est très dépendant de la quantité de Gn produite dans les phases tardives de l'infection virale, et notamment pour la formation des nouvelles particules virales. Une fois que les mécanismes moléculaires induits par les mutations en position 10 et 384 seront caractérisés, nous pourrons certainement mieux comprendre comment ces deux mutations interagissent fonctionnellement.

#### 5.4 Conclusion

Mes travaux de thèse mettent en évidence que la diversité génétique de certaines souches de RVFV est un moteur fort de différences de dynamique de réplication et de virulence. Nous avons identifié le segment M comme celui portant les déterminants viraux à l'origine de ces différences. L'exploration de la diversité intra-souche du segment M m'a permis d'identifier plus précisément deux marqueurs génétiques impliqués dans la modulation de la cinétique de réplication du RVFV *in vitro*. J'ai proposé plusieurs hypothèses permettant d'expliquer les mécanismes par lesquels ces marqueurs génétiques du génome de RVFV pourraient agir. La

caractérisation de ces mécanismes devrait permettre, à terme, de mieux comprendre la virulence et la pathogénèse induite par ce virus. Mes résultats constituent aussi une base intéressante pour étudier plus en détail les interactions du virus avec les cellules, notamment le rôle de la protéine Gn dans le cycle viral mais aussi la régulation de l'expression des protéines virales codées par le segment M. Enfin, mes travaux se sont concentrés sur l'étude de RVFV dans un contexte d'hôtes mammifères mais les différents outils viraux que j'ai pu développer au cours de ma thèse devraient aussi permettre de mieux comprendre les déterminants viraux impliqués dans la transmission de RVFV par ses vecteurs insectes.

## 6 Références

- Abdo-Salem, Shaif, Annelise Tran, Vladimir Grosbois, Guillaume Gerbier, Mansoor Al-Qadasi, Khalid Saeed, Eric Etter, Etienne Thiry, François Roger, et Véronique Chevalier. 2011. « Can Environmental and Socioeconomic Factors Explain the Recent Emergence of Rift Valley Fever in Yemen, 2000-2001? » *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (6): 773-79. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0084>.
- Abdo-Salem, Shaif, Agnès Waret-Szkuta, François Roger, Marie-Marie Olive, Khalid Saeed, et Véronique Chevalier. 2011. « Risk Assessment of the Introduction of Rift Valley Fever from the Horn of Africa to Yemen via Legal Trade of Small Ruminants ». *Tropical Animal Health and Production* 43 (2): 471-80. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9719-7>.
- Abudurexiti, Abulikemu, Scott Adkins, Daniela Alioto, Sergey V. Alkhovsky, Tatjana Avšič-Županc, Matthew J. Ballinger, Dennis A. Bente, et al. 2019. « Taxonomy of the Order Bunyavirales: Update 2019 ». *Archives of Virology* 164 (7): 1949-65. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>.
- Adam, Ishag, et Mubarak S. Karsany. 2008. « Case Report: Rift Valley Fever with Vertical Transmission in a Pregnant Sudanese Woman ». *Journal of Medical Virology* 80 (5): 929. <https://doi.org/10.1002/jmv.21132>.
- Aiewsakun, Pakorn, Patrawee Nilplub, Patompon Wongtrakoongate, Suradej Hongeng, et Arunee Thitithanyanont. 2021. « SARS-CoV-2 Genetic Variations Associated with COVID-19 Pathogenicity ». *Microbial Genomics* 7 (12). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000734>.
- Akakpo, Ayayi Justin, M Some, P Bornarel, A Jouan, et Jean-Paul Gonzalez. 1989. « [Epidemiology of Rift Valley fever in western Africa. I. Serologic survey in domestic ruminants of Burkina Faso] ». *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales* 82 (février): 321-31.
- Albariño, César G., Brian H. Bird, et Stuart T. Nichol. 2007. « A Shared Transcription Termination Signal on Negative and Ambisense RNA Genome Segments of Rift Valley Fever, Sandfly Fever Sicilian, and Toscana Viruses ». *Journal of Virology* 81 (10): 5246-56. <https://doi.org/10.1128/JVI.02778-06>.
- Albe, Joseph R., Devin A. Boyles, Aaron W. Walters, Michael R. Kujawa, Cynthia M. McMillen, Douglas S. Reed, et Amy L. Hartman. 2019. « Neutrophil and Macrophage Influx into the Central Nervous System Are Inflammatory Components of Lethal Rift Valley Fever Encephalitis in Rats ». *PLoS Pathogens* 15 (6): e1007833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007833>.
- Allen, Elizabeth R., Stefanie A. Krumm, Jayna Raghwan, Steinar Halldorsson, Angela Elliott, Victoria A. Graham, Elina Koudriakova, et al. 2018. « A Protective Monoclonal Antibody Targets a Site of Vulnerability on the Surface of Rift Valley Fever Virus ». *Cell Reports* 25 (13): 3750-3758.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.001>.
- Allison, S. L., J. Schalich, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz, et F. X. Heinz. 1995. « Oligomeric Rearrangement of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Proteins Induced by an Acidic PH ». *Journal of Virology* 69 (2): 695-700. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.2.695-700.1995>.
- Anderson, G. W., et C. J. Peters. 1988. « Viral Determinants of Virulence for Rift Valley Fever (RVF) in Rats ». *Microbial Pathogenesis* 5 (4): 241-50. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(88\)90096-4](https://doi.org/10.1016/0882-4010(88)90096-4).

- Anderson, G. W., T. W. Slone, et C. J. Peters. 1987. « Pathogenesis of Rift Valley Fever Virus (RVFV) in Inbred Rats ». *Microbial Pathogenesis* 2 (4): 283-93. [https://doi.org/10.1016/0882-4010\(87\)90126-4](https://doi.org/10.1016/0882-4010(87)90126-4).
- Anthony, Tasneem, Antoinette van Schalkwyk, Marco Romito, Lieza Odendaal, Sarah J. Clift, et A. Sally Davis. 2021. « Vaccination with Rift Valley Fever Virus Live Attenuated Vaccine Strain Smithburn Caused Meningoencephalitis in Alpacas ». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 33 (4): 777-81. <https://doi.org/10.1177/10406387211015294>.
- Anyamba, Assaf, Kenneth J. Linthicum, Jennifer Small, Seth C. Britch, Edwin Pak, Stephane de La Rocque, Pierre Formenty, et al. 2010. « Prediction, Assessment of the Rift Valley Fever Activity in East and Southern Africa 2006-2008 and Possible Vector Control Strategies ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (2 Suppl): 43-51. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0289>.
- Apolloni, Andrea, Gaëlle Nicolas, Caroline Coste, Ahmed Bezeid EL Mamy, Barry Yahya, Ahmed Salem EL Arbi, Mohamed Baba Gueya, Doumbia Baba, Marius Gilbert, et Renaud Lancelot. 2018. « Towards the description of livestock mobility in Sahelian Africa: Some results from a survey in Mauritania ». *PLoS ONE* 13 (1): e0191565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191565>.
- Arishi, Haider M., Ali Y. Aqeel, et Mohamed M. Al Hazmi. 2006. « Vertical Transmission of Fatal Rift Valley Fever in a Newborn ». *Annals of Tropical Paediatrics* 26 (3): 251-53. <https://doi.org/10.1179/146532806X120363>.
- Arsevska, Elena, Renaud Lancelot, Ahmed Bezeid El Mamy, et Catherine Cetre-Sossah. 2016. « Situation épidémiologique de la fièvre de la Vallée du Rift en Afrique de l'Ouest et du Nord ». *Bulletin Epidémiologique*. <https://agritrop.cirad.fr/580830/>.
- Arsevska, Elena, Mathieu Roche, Pascal Hendrikx, David Chavernac, Sylvain Falala, Renaud Lancelot, et Barbara Dufour. 2016. « Identification of terms for detecting early signals of emerging infectious disease outbreaks on the web ». *Computers and Electronics in Agriculture* 123 (avril): 104-15. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.02.010>.
- Ayari-Fakhfakh, Emna, Tânia Zaverucha do Valle, Laurent Guillemot, Jean-Jacques Panthier, Michèle Bouloy, Abdeljelil Ghram, Emmanuel Albina, et Catherine Cêtre-Sossah. 2012. « MBT/Pas Mouse: A Relevant Model for the Evaluation of Rift Valley Fever Vaccines ». *The Journal of General Virology* 93 (Pt 7): 1456-64. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042754-0>.
- Baek, Minkyung, Frank DiMaio, Ivan Anishchenko, Justas Dauparas, Sergey Ovchinnikov, Gyu Rie Lee, Jue Wang, et al. 2021. « Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network ». *Science* 373 (6557): 871-76. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.
- Bahadur, Ranjit Prasad, Francis Rodier, et Joël Janin. 2007. « A Dissection of the Protein-Protein Interfaces in Icosahedral Virus Capsids ». *Journal of Molecular Biology* 367 (2): 574-90. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.054>.
- Bai, Fengwei, Kok-Fai Kong, Jianfeng Dai, Feng Qian, Lin Zhang, Charles R. Brown, Erol Fikrig, et Ruth R. Montgomery. 2010. « A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus ». *The Journal of Infectious Diseases* 202 (12): 1804-12. <https://doi.org/10.1086/657416>.
- Baranitharan Ph D, Dr. 2018. *Introduction of Vector Mosquitoes*.



- Barry, Yahya, Ahmed Elbara, Mohamed Abdallahi Bollahi, Ahmed B. Ould El Mamy, Mokhtar Fall, Abdellahi Diambar Beyit, Mariem Seyidna Khayar, et al. 2022a. « Rift Valley Fever, Mauritania, 2020: Lessons of a One Health Approach ». SSRN Scholarly Paper 4087383. Rochester, NY: Social Science Research Network. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4087383>.
- Bell, T. M., T. E. Bunton, C. I. Shaia, J. W. Raymond, S. P. Honnold, G. C. Donnelly, J. D. Shamblin, E. R. Wilkinson, et K. A. Cashman. 2016. « Pathogenesis of Bolivian Hemorrhagic Fever in Guinea Pigs ». *Veterinary Pathology* 53 (1): 190-99. <https://doi.org/10.1177/0300985815588609>.
- Bergren, Nicholas A., Erin M. Borland, Daniel A. Hartman, et Rebekah C. Kading. 2021. « Laboratory Demonstration of the Vertical Transmission of Rift Valley Fever Virus by *Culex Tarsalis* Mosquitoes ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15 (3): e0009273. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009273>.
- Bifani, Amanda Makha, Milly M. Choy, Hwee Cheng Tan, et Eng Eong Ooi. 2021. « Attenuated Dengue Viruses Are Genetically More Diverse than Their Respective Wild-Type Parents ». *Npj Vaccines* 6 (1): 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00340-5>.
- Billecocq, Agnès, Nicolas Gaudiard, Nicolas Le May, Richard M. Elliott, Ramon Flick, et Michèle Bouloy. 2008. « RNA Polymerase I-Mediated Expression of Viral RNA for the Rescue of Infectious Virulent and Avirulent Rift Valley Fever Viruses ». *Virology* 378 (2): 377-84. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.05.033>.
- Billecocq, Agnès, Martin Spiegel, Pierre Vialat, Alain Kohl, Friedemann Weber, Michèle Bouloy, et Otto Haller. 2004. « NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Blocks Interferon Production by Inhibiting Host Gene Transcription ». *Journal of Virology* 78 (18): 9798-9806. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.18.9798-9806.2004>.
- Bird, Brian H., César G. Albariño, Amy L. Hartman, Bobbie Rae Erickson, Thomas G. Ksiazek, et Stuart T. Nichol. 2008. « Rift Valley Fever Virus Lacking the NSs and NSm Genes Is Highly Attenuated, Confers Protective Immunity from Virulent Virus Challenge, and Allows for Differential Identification of Infected and Vaccinated Animals ». *Journal of Virology* 82 (6): 2681-91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02501-07>.
- Bird, Brian H., César G. Albariño, et Stuart T. Nichol. 2007. « Rift Valley Fever Virus Lacking NSm Proteins Retains High Virulence in Vivo and May Provide a Model of Human Delayed Onset Neurologic Disease ». *Virology* 362 (1): 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.046>.
- Bird, Brian H., Jane W. K. Githinji, Joseph M. Macharia, Jacqueline L. Kasiiti, Rees M. Muriithi, Stephen G. Gacheru, Joseph O. Musaa, et al. 2008. « Multiple Virus Lineages Sharing Recent Common Ancestry Were Associated with a Large Rift Valley Fever Outbreak among Livestock in Kenya during 2006-2007 ». *Journal of Virology* 82 (22): 11152-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.01519-08>.
- Bird, Brian H., Marina L. Khristova, Pierre E. Rollin, Thomas G. Ksiazek, et Stuart T. Nichol. 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 ». *Journal of Virology* 81 (6): 2805-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02095-06>.
- Bird, Brian H., Thomas G. Ksiazek, Stuart T. Nichol, et N. James Maclachlan. 2009. « Rift Valley Fever Virus ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234 (7): 883-93. <https://doi.org/10.2460/javma.234.7.883>.

- Biteye, Biram, Assane Gueye Fall, Momar Talla Seck, Mamadou Ciss, Mariame Diop, et Geoffrey Gimonneau. 2019. « Host-Feeding Patterns of *Aedes (Aedimorphus) vexans arabiensis*, a Rift Valley Fever Virus Vector in the Ferlo Pastoral Ecosystem of Senegal ». *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215194>.
- Bob, Ndeye Sakha, Hampâté Bâ, Gamou Fall, Elkhilil Ishagh, Mamadou Y. Diallo, Abdourahmane Sow, Pape Mbacké Sembene, et al. 2017. « Detection of the Northeastern African Rift Valley Fever Virus Lineage During the 2015 Outbreak in Mauritania ». *Open Forum Infectious Diseases* 4 (2): ofx087. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx087>.
- Bob, Ndeye Sakha, Mamadou Aliou Barry, Moussa Moise Diagne, Martin Faye, Marie Henriette Dior Ndione, Amadou Diallo, Mamadou Diop, et al. 2022. « Detection of Rift Valley Fever Virus Lineage H From South Africa Through the Syndromic Sentinel Surveillance Network in Senegal ». *Open Forum Infectious Diseases* 9 (3): ofab655. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab655>.
- Boer, S. M. de, J. Kortekaas, C. A. M. de Haan, P. J. M. Rottier, R. J. M. Moormann, et B. J. Bosch. 2012. « Heparan Sulfate Facilitates Rift Valley Fever Virus Entry into the Cell ». *Journal of Virology* 86 (24): 13767-71. <https://doi.org/10.1128/JVI.01364-12>.
- Boer, S. M. de, J. Kortekaas, L. Spel, P. J. M. Rottier, R. J. M. Moormann, et B. J. Bosch. 2012. « Acid-Activated Structural Reorganization of the Rift Valley Fever Virus Gc Fusion Protein ». *Journal of Virology* 86 (24): 13642. <https://doi.org/10.1128/JVI.01973-12>.
- Borrego, Belén, Sandra Moreno, Nuria de la Losa, Friedemann Weber, et Alejandro Brun. 2021. « The Change P82L in the Rift Valley Fever Virus NSs Protein Confers Attenuation in Mice ». *Viruses* 13 (4): 542. <https://doi.org/10.3390/v13040542>.
- Bouloy, M., C. Janzen, P. Vialat, H. Khun, J. Pavlovic, M. Huerre, et O. Haller. 2001. « Genetic Evidence for an Interferon-Antagonistic Function of Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs ». *Journal of Virology* 75 (3): 1371-77. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1371-1377.2001>.
- Bouloy, Michele, et Ramon Flick. 2009. « Reverse Genetics Technology for Rift Valley Fever Virus: Current and Future Applications for the Development of Therapeutics and Vaccines ». *Antiviral Research* 84 (2): 101-18. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.08.002>.
- Bouloy, Michele, et Friedemann Weber. 2010. « Molecular Biology of Rift Valley Fever Virus ». *The Open Virology Journal* 4 (avril): 8-14. <https://doi.org/10.2174/1874357901004010008>.
- Boushab, Boushab Mohamed, Fatima Zahra Fall-Malick, Sidi El Wafi Ould Baba, Mohamed Lemine Ould Salem, Marie Roseline Darnycka Belizaire, Hamade Ledib, Mohamed Mahmoud Ould Baba Ahmed, Leonardo Kishi Basco, et Hampaté Ba. 2016. « Severe Human Illness Caused by Rift Valley Fever Virus in Mauritania, 2015 ». *Open Forum Infectious Diseases* 3 (4). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw200>.
- Boyles, Devin A., Madeline M. Schwarz, Joseph R. Albe, Cynthia M. McMillen, Katherine J. O'Malley, Douglas S. Reed, et Amy L. Hartman. 2021. « Development of Rift Valley Fever Encephalitis in Rats Is Mediated by Early Infection of Olfactory Epithelium and Neuroinvasion across the Cribriform Plate ». *The Journal of General Virology* 102 (2). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001522>.

- Brennan, Benjamin, Stephen R. Welch, et Richard M. Elliott. 2014. « The Consequences of Reconfiguring the Ambisense S Genome Segment of Rift Valley Fever Virus on Viral Replication in Mammalian and Mosquito Cells and for Genome Packaging ». *PLOS Pathogens* 10 (2): e1003922. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003922>.
- Bridgen, A., et R. M. Elliott. 1996. « Rescue of a Segmented Negative-Strand RNA Virus Entirely from Cloned Complementary DNAs ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (26): 15400-404. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15400>.
- Buchholz, U. J., S. Finke, et K. K. Conzelmann. 1999. « Generation of Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) from CDNA: BRSV NS2 Is Not Essential for Virus Replication in Tissue Culture, and the Human RSV Leader Region Acts as a Functional BRSV Genome Promoter ». *Journal of Virology* 73 (1): 251-59. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.251-259.1999>.
- Busquets, Núria, Gema Lorenzo, Elena López-Gil, Raquel Rivas, David Solanes, Iván Galindo-Cardiel, F. Xavier Abad, et al. 2014. « Efficacy Assessment of an MVA Vectored Rift Valley Fever Vaccine in Lambs ». *Antiviral Research* 108 (août): 165-72. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.05.020>.
- Busquets, Nuria, F. Xavier, Raquel Martín-Folgar, Gema Lorenzo, Iván Galindo-Cardiel, Bernat Pérez del Val, Raquel Rivas, et al. 2010. « Experimental Infection of Young Adult European Breed Sheep with Rift Valley Fever Virus Field Isolates ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 10 (7): 689-96. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0205>.
- Cain, Matthew D., Hamid Salimi, Michael S. Diamond, et Robyn S. Klein. 2019. « Mechanisms of Pathogen Invasion into the Central Nervous System ». *Neuron* 103 (5): 771-83. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.015>.
- Calvo, Sarah E., David J. Pagliarini, et Vamsi K. Mootha. 2009. « Upstream Open Reading Frames Cause Widespread Reduction of Protein Expression and Are Polymorphic among Humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18): 7507-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810916106>.
- Calvo-Pinilla, Eva, Alejandro Marín-López, Sandra Moreno, Gema Lorenzo, Sergio Utrilla-Trigo, Luis Jiménez-Cabello, Julio Benavides, et al. 2020. « A Protective Bivalent Vaccine against Rift Valley Fever and Bluetongue ». *Npj Vaccines* 5 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00218-y>.
- Caminade, Cyril, Jacques A. Ndione, Mawlouth Diallo, Dave A. MacLeod, Ousmane Faye, Yamar Ba, Ibrahima Dia, et Andrew P. Morse. 2014. « Rift Valley Fever Outbreaks in Mauritania and Related Environmental Conditions ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (1): 903-18. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100903>.
- Campbell, Grant L., Anthony A. Marfin, Robert S. Lanciotti, et Duane J. Gubler. 2002. « West Nile Virus ». *The Lancet. Infectious Diseases* 2 (9): 519-29. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00368-7).
- Caplen, Howard, C. J. Peters, et David H. L. YR 1985 Bishop. s. d. « Mutagen-directed Attenuation of Rift Valley Fever Virus as a Method for Vaccine Development ». *Journal of General Virology* 66 (10): 2271-77. Consulté le 12 mai 2022. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2271>.
- Carnec, Xavier, Myriam Ermonval, Felix Kreher, Marie Flamand, et Michèle Bouloy. 2014. « Role of the Cytosolic Tails of Rift Valley Fever Virus Envelope Glycoproteins in Viral Morphogenesis ». *Virology* 448 (janvier): 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.09.023>.

- Cartwright, Haley N., Dominique J. Barbeau, Joshua D. Doyle, Ed Klein, Mark T. Heise, Martin T. Ferris, et Anita K. McElroy. 2022. « Genetic Diversity of Collaborative Cross Mice Enables Identification of Novel Rift Valley Fever Virus Encephalitis Model ». *PLoS Pathogens* 18 (7): e1010649. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010649>.
- Cavener, D R. 1987. « Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in Drosophila and vertebrates. » *Nucleic Acids Research* 15 (4): 1353-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC340553/>.
- Cecilia, Hélène, Raphaëlle Métras, Assane Gueye Fall, Modou Moustapha Lo, Renaud Lancelot, et Pauline Ezanno. 2020. « It's Risky to Wander in September: Modelling the Epidemic Potential of Rift Valley Fever in a Sahelian Setting ». *Epidemics* 33 (décembre): 100409. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2020.100409>.
- Cecilia, Hélène, Roosmarie Vriens, Paul J. Wichgers Schreur, Mariken M. de Wit, Raphaëlle Métras, Pauline Ezanno, et Quirine A. Ten Bosch. 2022. « Heterogeneity of Rift Valley Fever Virus Transmission Potential across Livestock Hosts, Quantified through a Model-Based Analysis of Host Viral Load and Vector Infection ». *PLoS Computational Biology* 18 (7): e1010314. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010314>.
- Cêtre-Sossah, Catherine, Aurélie Pédarrieu, Mikael Juremalm, Petrus Jansen Van Vuren, Alejandro Brun, Ahmed Bezeid Ould EL Mamy, Jean-Michel Héraud, et al. 2019. « Development and validation of a pen side test for Rift Valley fever ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13 (9): e0007700. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007700>.
- Cêtre-Sossah, Catherine, Hervé Zeller, Marc Grandadam, Valérie Caro, François Petinelli, Michèle Bouloy, Eric Cardinale, et Emmanuel Albina. 2012. « Genome Analysis of Rift Valley Fever Virus, Mayotte ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (6). <https://doi.org/10.3201/eid1806.110994>.
- Chen, Zhongzhou, Hong-Wei Wang, Xue Wang, Cuixia Hu, Jia Wang, Xiaofei Dong, Jie Xu, et al. 2021. *Structural insights into Rift Valley fever virus replication machinery*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-398449/v1>.
- Chrun, Tiphany, Sandra Lacôte, Céline Urien, Luc Jouneau, Céline Barc, Edwige Bouguyon, Vanessa Contreras, et al. 2018. « A Rift Valley Fever Virus Gn Ectodomain-Based DNA Vaccine Induces a Partial Protection Not Improved by APC Targeting ». *Npj Vaccines* 3 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0052-x>.
- Chrun, Tiphany, Sandra Lacôte, Céline Urien, Charles-Adrien Richard, Matthias Tenbusch, Nicolas Aubrey, Coralie Pulido, Latifa Lakhdar, Philippe Marianneau, et Isabelle Schwartz-Cornil. 2019. « A DNA Vaccine Encoding the Gn Ectodomain of Rift Valley Fever Virus Protects Mice via a Humoral Response Decreased by DEC205 Targeting ». *Frontiers in Immunology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00860>.
- Ciota, Alexander, et Laura Kramer. 2013. « Vector-Virus Interactions and Transmission Dynamics of West Nile Virus ». *Viruses* 5 (décembre): 3021-47. <https://doi.org/10.3390/v5123021>.
- Clark, Madeleine H. A., George M. Warimwe, Antonello Di Nardo, Nicholas A. Lyons, et Simon Gubbins. 2018. « Systematic Literature Review of Rift Valley Fever Virus Seroprevalence in Livestock, Wildlife and Humans in Africa from 1968 to 2016 ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12 (7): e0006627. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006627>.

- Coetzer, J. A. 1977. « The Pathology of Rift Valley Fever. I. Lesions Occurring in Natural Cases in New-Born Lambs ». *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 44 (4): 205-11.
- Corwin, A., M. Habib, D. Watts, J. Olson, M. Darwish, R. Hibbs, B. Botros, M. Kleinosky, R. Shope, et M. Kilpatrick. 1993. « Prevalence of Antibody to Rift Valley Fever Virus in the Nile River Delta of Egypt, 13 Years after a Major Outbreak ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (2): 161. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90470-b](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90470-b).
- Cramer, J. 2003. « The Origins and Development of the Logit Model », août. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511615412.010>.
- Cyr, Normand, Cynthia de la Fuente, Lauriane Lecoq, Irene Guendel, Philippe R. Chabot, Kylee Kehn-Hall, et James G. Omichinski. 2015. « A ΩXaV Motif in the Rift Valley Fever Virus NSs Protein Is Essential for Degrading P62, Forming Nuclear Filaments and Virulence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (19): 6021-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503688112>.
- Daouam, S., F. Ghzal, Y. Naouli, K. O. Tadlaoui, M. M. Ennaji, C. Oura, et M. EL Harrak. 2016. « Safety and immunogenicity of a live attenuated Rift Valley fever vaccine (CL13T) in camels ». *BMC Veterinary Research* 12 (1): 154. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0775-8>.
- Daouam, Samira, Fatima Zohra Fakri, Moulay Mustapha Ennaji, Amal El arkam, Khalid Omari Tadlaoui, Christopher Oura, et Mehdi Elharrak. 2014. « Heat Stability of the Rift Valley Fever Virus Clone 13 Live Vaccines ». *Trials in Vaccinology* 3 (janvier): 61-64. <https://doi.org/10.1016/j.trivac.2014.03.001>.
- Daouam, Samira, Fadoua Ghzal, Amal El arkam, Yassir Naouli, Mohammed Jazouli, Moulay Mustapha Ennaji, Khalid Omari Tadlaoui, Chris Oura, et Mehdi Elharrak. 2015. « Evaluation of the Safety and Efficacy of a Live Attenuated Thermostable Rift Valley Fever Vaccine in Sheep, Goats and Cattle ». *open access journal* 6 (janvier). <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000295>.
- Daubney, R., J. R. Hudson, et P. C. Garnham. 1931. « Enzootic Hepatitis or Rift Valley Fever. An Undescribed Virus Disease of Sheep Cattle and Man from East Africa ». *The Journal of Pathology and Bacteriology* 34 (4): 545-79. <https://doi.org/10.1002/path.1700340418>.
- Decroly, Etienne, François Ferron, Julien Lescar, et Bruno Canard. 2011. « Conventional and Unconventional Mechanisms for Capping Viral mRNA ». *Nature Reviews. Microbiology* 10 (1): 51-65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2675>.
- Degener, Carolin M., Kyran M. Staunton, Hervé Bossin, Jérôme Marie, Richard Diogo da Silva, Daniela Cristina Lima, Álvaro E. Eiras, Karen I. Akaratovic, Jay Kiser, et Scott W. Gordon. 2021. « Evaluation of the New Modular Biogents BG-Pro Mosquito Trap in Comparison to CDC, EVS, BG-Sentinel, and BG-Mosquitaire Traps ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 37 (4): 224-41. <https://doi.org/10.2987/21-7003>.
- Dessau, Moshe, et Yorgo Modis. 2013. « Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (5): 1696-1701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217780110>.
- Digoutte, J. P., et C. J. Peters. 1989. « General Aspects of the 1987 Rift Valley Fever Epidemic in Mauritania ». *Research in Virology* 140 (1): 27-30. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(89\)80081-0](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(89)80081-0).

- Dodd, Kimberly A., Anita K. McElroy, Tara L. Jones, Sherif R. Zaki, Stuart T. Nichol, et Christina F. Spiropoulou. 2014. « Rift Valley Fever Virus Encephalitis Is Associated with an Ineffective Systemic Immune Response and Activated T Cell Infiltration into the CNS in an Immunocompetent Mouse Model ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8 (6): e2874. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002874>.
- Drosten, Christian, Stephan Göttig, Stefan Schilling, Marcel Asper, Marcus Panning, Herbert Schmitz, et Stephan Günther. 2002. « Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2323-30. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2323-2330.2002>.
- Drouin, Alex, Véronique Chevalier, Benoit Durand, et Thomas Balenghien. 2022. « Vector Competence of Mediterranean Mosquitoes for Rift Valley Fever Virus: A Meta-Analysis ». *Pathogens* 11 (5): 503. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050503>.
- El Mamy, Ahmed B., Modou M. Lo, Yaya Thiongane, Mariame Diop, Katia Isselmou, Baba Doumbia, Mohammed Ould Baba, et al. 2014. « Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of Rift Valley Fever Virus: The 2010 Northern Mauritania Outbreak in the Camelus Dromedarius Species ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 14 (12): 856-61. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1605>.
- El Mamy, Ahmed B. Ould, Mohamed Ould Baba, Yahya Barry, Katia Isselmou, Mamadou L. Dia, Ba Hampate, Mamadou Y. Diallo, et al. 2011. « Unexpected Rift Valley Fever Outbreak, Northern Mauritania ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (10): 1894-96. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110397>.
- Elfadil, A. A., K. A. Hasab-Allah, et O. M. Dafa-Allah. 2006. « Factors Associated with Rift Valley Fever in South-West Saudi Arabia ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 25 (3): 1137-45.
- Erasmus, B. J., et J. a. W. Coetzer. 1981. « Symptomatology and Pathology of Rift Valley Fever in Domestic Animals ». *Proceedings ... Rift Valley Fever ; a Workshop*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=symptomatology+and+pathology+of+Rift+Valley+fever+in+domestic+animals&author=Erasmus%2C+B.J.&publication\\_year=1981](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=symptomatology+and+pathology+of+Rift+Valley+fever+in+domestic+animals&author=Erasmus%2C+B.J.&publication_year=1981).
- Faburay, Bonto, Natasha N. Gaudreault, Qinfang Liu, A. Sally Davis, Vinay Shivanna, Sun Young Sunwoo, Yuekun Lang, et al. 2016. « Development of a Sheep Challenge Model for Rift Valley Fever ». *Virology* 489 (février): 128-40. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.12.003>.
- Faburay, Bonto, Angelle Desiree LaBeaud, D. Scott McVey, William C. Wilson, et Juergen A. Richt. 2017. « Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development ». *Vaccines* 5 (3): 29. <https://doi.org/10.3390/vaccines5030029>.
- Fall, Assane Gueye, Amadou Diaite, Eric Etter, Jérémy Bouyer, T. Ndiaye, et Lassana Konaté. 2012. « The Mosquito Aedes (Aedimorphus) Vexans Arabiensis as a Probable Vector Bridging the West Nile Virus between Birds and Horses in Barkedji (Ferlo, Senegal) ». *Medical and Veterinary Entomology*. <https://agritrop.cirad.fr/563091/>.

- Farajollahi, Ary, Dina M. Fonseca, Laura D. Kramer, et A. Marm Kilpatrick. 2011. « “Bird Biting” Mosquitoes and Human Disease: A Review of the Role of Culex Pipiens Complex Mosquitoes in Epidemiology ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 11 (7): 1577-85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.013>.
- Fawzy, Mohamed, et Yosra A. Helmy. 2019. « The One Health Approach is Necessary for the Control of Rift Valley Fever Infections in Egypt: A Comprehensive Review ». *Viruses* 11 (2): 139. <https://doi.org/10.3390/v11020139>.
- Faye, Ousmane, Hampathé Ba, Yamar Ba, Caio C.M. Freire, Oumar Faye, Oumar Ndiaye, Isselmou Elgady, Paolo M.A. Zanotto, Mawlouth Diallo, et Amadou Sall. 2014. « Reemergence of Rift Valley Fever, Mauritania, 2010 ». *Emerging Infectious Disease journal* 20 (2): 300. <https://doi.org/10.3201/eid2002.130996>.
- Faye, Ousmane, Mawlouth Diallo, Djibril Diop, O. Elmamy Bezeid, Hampathé Bâ, Mbayame Niang, Ibrahima Dia, et al. 2007. « Rift Valley Fever Outbreak with East-Central African Virus Lineage in Mauritania, 2003 ». *Emerging Infectious Diseases* 13 (7): 1016-23. <https://doi.org/10.3201/eid1307.061487>.
- Ferron, François, Zongli Li, Eric I. Danek, Dahai Luo, Yeehwa Wong, Bruno Coutard, Violaine Lantéz, et al. 2011. « The Hexamer Structure of the Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein Suggests a Mechanism for Its Assembly into Ribonucleoprotein Complexes ». *PLOS Pathogens* 7 (5): e1002030. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002030>.
- Filone, Claire Marie, Mark Heise, Robert W. Doms, et Andrea Bertolotti-Ciarlet. 2006. « Development and Characterization of a Rift Valley Fever Virus Cell-Cell Fusion Assay Using Alphavirus Replicon Vectors ». *Virology* 356 (1-2): 155-64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.035>.
- Flick, Ramon, Fredrik Elgh, et Ralf F. Pettersson. 2002. « Mutational Analysis of the Uukuniemi Virus (Bunyaviridae Family) Promoter Reveals Two Elements of Functional Importance ». *Journal of Virology* 76 (21): 10849-60. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.21.10849-10860.2002>.
- Flick, Ramon, Kirsten Flick, Heinz Feldmann, et Fredrik Elgh. 2003. « Reverse Genetics for Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus ». *Journal of Virology* 77 (10): 5997-6006. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.10.5997-6006.2003>.
- Fontenille, D, M Traore-Lamizana, M Diallo, J Thonnon, J P Digoutte, et H G Zeller. 1998. « New vectors of Rift Valley fever in West Africa. » *Emerging Infectious Diseases* 4 (2): 289-93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2640145/>.
- Freire, Caio C. M., Atila Iamarino, Peinda O. Ly Soumaré, Ousmane Faye, Amadou A. Sall, et Paolo M. A. Zanotto. 2015. « Reassortment and Distinct Evolutionary Dynamics of Rift Valley Fever Virus Genomic Segments ». *Scientific Reports* 5 (1): 11353. <https://doi.org/10.1038/srep11353>.
- Ganaie, Safder S., Madeline M. Schwarz, Cynthia M. McMillen, David A. Price, Annie X. Feng, Joseph R. Albe, Wenjie Wang, et al. 2021. « Lrp1 Is a Host Entry Factor for Rift Valley Fever Virus ». *Cell* 184 (20): 5163-5178.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.001>.
- Gaudreault, Natasha N., Sabarish V. Indran, Velmurugan Balaraman, William C. Wilson, et Juergen A. Richt. 2019. « Molecular Aspects of Rift Valley Fever Virus and the Emergence of Reassortants ». *Virus Genes* 55 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1611-y>.

- Gauliard, Nicolas, Agnès Billecocq, Ramon Flick, et Michèle Bouloy. 2006. « Rift Valley Fever Virus Noncoding Regions of L, M and S Segments Regulate RNA Synthesis ». *Virology* 351 (1): 170-79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.03.018>.
- Gerdes, G. H. 2004. « Rift Valley Fever ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 23 (2): 613-23. <https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1500>.
- Gerken, Keli N., A. Desirée LaBeaud, Henshaw Mandi, Maïna L'Azou Jackson, J. Gabrielle Breugelmans, et Charles H. King. 2022. « Paving the Way for Human Vaccination against Rift Valley Fever Virus: A Systematic Literature Review of RVFV Epidemiology from 1999 to 2021 ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16 (1): e0009852. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009852>.
- Gerrard, Sonja R., Brian H. Bird, Cesar G. Albariño, et Stuart T. Nichol. 2007. « The NSm Proteins of Rift Valley Fever Virus Are Dispensable for Maturation, Replication and Infection ». *Virology* 359 (2): 459-65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.035>.
- Gerrard, Sonja R., et Stuart T. Nichol. 2002. « Characterization of the Golgi Retention Motif of Rift Valley Fever Virus G(N) Glycoprotein ». *Journal of Virology* 76 (23): 12200-210. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.12200-12210.2002>.
- Giorgi, Colomba, Luisa Accardi, Loredana Nicoletti, Maria Cristina Gro, Kazuaki Takehara, Corinne Hilditch, Shigeru Morikawa, et David H. L. Bishop. 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 (2): 738-53. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90087-R](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90087-R).
- Gogrefe, Nadja, Sophia Reindl, Stephan Günther, et Maria Rosenthal. 2019. « Structure of a functional cap-binding domain in Rift Valley fever virus L protein ». *PLoS Pathogens* 15 (5): e1007829. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007829>.
- Gomes, Bruno, Carla A. Sousa, José L. Vicente, Leonor Pinho, Isabel Calderón, Eliane Arez, António PG Almeida, Martin J. Donnelly, et João Pinto. 2013. « Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization ». *Parasites & Vectors* 6 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-93>.
- Gommet, Céline, Agnès Billecocq, Grégory Jouvion, Milena Hasan, Tânia Zaverucha do Valle, Laurent Guillemot, Charlène Blanchet, et al. 2011. « Tissue Tropism and Target Cells of NSs-Deleted Rift Valley Fever Virus in Live Immunodeficient Mice ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (12): e1421. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001421>.
- Grobbelaar, A. A., J. Weyer, P. Leman, A. Kemp, et J. T. Paweska. 2014. « Phylogeny of Rift Valley Fever Virus Isolates Recovered from Humans during 2008-2011 Disease Outbreaks in South Africa ». *International Journal of Infectious Diseases* 21 (avril): 224. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.887>.
- Grobbelaar, Antoinette A., Jacqueline Weyer, Patricia A. Leman, Alan Kemp, Janusz T. Paweska, et Robert Swanepoel. 2011. « Molecular Epidemiology of Rift Valley Fever Virus ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (12): 2270-76. <https://doi.org/10.3201/eid1712.111035>.
- Grolla, Allen, Masfique Mehedi, Robbin Lindsay, Catharine Bosio, Adriano Duse, et Heinz Feldmann. 2012. « Enhanced Detection of Rift Valley Fever Virus using



- Molecular Assays on Whole Blood Samples ». *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 54 (mai): 313-17. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.022>.
- Grossi-Soyster, Elysse N., Justin Lee, Charles H. King, et A. Desiree LaBeaud. 2019. « The Influence of Raw Milk Exposures on Rift Valley Fever Virus Transmission ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (3): e0007258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007258>.
- Guardado-Calvo, P., K. Atkovska, S. A. Jeffers, N. Grau, M. Backovic, J. Pérez-Vargas, S. M. de Boer, et al. 2017. « A Glycerophospholipid-Specific Pocket in the RVFV Class II Fusion Protein Drives Target Membrane Insertion ». *Science (New York, N.Y.)* 358 (6363): 663-67. <https://doi.org/10.1126/science.aal2712>.
- Habjan, Matthias, Nicola Penski, Valentina Wagner, Martin Spiegel, Anna K. Överby, Georg Kochs, Juha T. Huiskonen, et Friedemann Weber. 2009. « Efficient Production of Rift Valley Fever Virus-like Particles: The Antiviral Protein MxA Can Inhibit Primary Transcription of Bunyaviruses ». *Virology* 385 (2): 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.011>.
- Habjan, Matthias, Andreas Pichlmair, Richard M. Elliott, Anna K. Overby, Timo Glatter, Matthias Gstaiger, Giulio Superti-Furga, Hermann Unger, et Friedemann Weber. 2009. « NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Induces the Specific Degradation of the Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase ». *Journal of Virology* 83 (9): 4365-75. <https://doi.org/10.1128/JVI.02148-08>.
- Halldorsson, Steinar, Sai Li, Mengqiu Li, Karl Harlos, Thomas A. Bowden, et Juha T. Huiskonen. 2018a. « Shielding and Activation of a Viral Membrane Fusion Protein ». *Nature Communications* 9 (1): 349. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02789-2>.
- Halldorsson, Steinar, Sai Li, Mengqiu Li, Karl Harlos, Thomas Bowden, et Juha Huiskonen. 2018b. « Shielding and activation of a viral membrane fusion protein ». *Nature Communications* 9 (janvier). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02789-2>.
- Harmon, Brooke, Benjamin R. Schudel, Dianna Maar, Carol Kozina, Tetsuro Ikegami, Chien-Te Kent Tseng, et Oscar A. Negrete. 2012. « Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis ». *Journal of Virology* 86 (23): 12954-70. <https://doi.org/10.1128/JVI.02242-12>.
- Hartman, Amy. 2017. « Rift Valley Fever ». *Clinics in laboratory medicine* 37 (2): 285-301. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.004>.
- Hayashi, Miyuki, Eric P. Schultz, Jean-Marc Lanchy, et J. Stephen Lodmell. 2021. « Time-Resolved Analysis of N-RNA Interactions during RVFV Infection Shows Qualitative and Quantitative Shifts in RNA Encapsidation and Packaging ». *Viruses* 13 (12): 2417. <https://doi.org/10.3390/v13122417>.
- Hayes, Edward B., Nicholas Komar, Roger S. Nasci, Susan P. Montgomery, Daniel R. O'Leary, et Grant L. Campbell. 2005. « Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease ». *Emerging Infectious Diseases* 11 (8): 1167-73. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>.
- Hesson, Jenny C., Örjan Östman, Martina Schäfer, et Jan O. Lundström. 2011. « Geographic Distribution and Relative Abundance of the Sibling Vector Species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11 (10): 1383-89. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0630>.

- Hiranuma, Naozumi, Hahnbeom Park, Minkyung Baek, Ivan Anishchanka, Justas Dauparas, et David Baker. 2020. « Improved Protein Structure Refinement Guided by Deep Learning Based Accuracy Estimation ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.17.209643>.
- Hongoh, Valerie, Lea Berrang-Ford, Nicholas Ogden, Robbin Lindsay, M. Scott, et H. Artsob. 2009. « A review of environmental determinants and risk factors for avian-associated mosquito arboviruses in Canada ». *Biodiversity* 10 (septembre): 83-91. <https://doi.org/10.1080/14888386.2009.9712849>.
- Hopp, Marianne, et Jonathan Foley. 2001. « Global-scale relationships between climate and the dengue fever vector, Aedes Aegypti ». *Climatic Change* 48 (février): 441-63. <https://doi.org/10.1023/A:1010717502442>.
- Huiskonen, Juha T., Anna K. Överby, Friedemann Weber, et Kay Grünewald. 2009. « Electron Cryo-Microscopy and Single-Particle Averaging of Rift Valley Fever Virus: Evidence for GN-GC Glycoprotein Heterodimers ». *Journal of Virology* 83 (8): 3762-69. <https://doi.org/10.1128/JVI.02483-08>.
- Hulswit, Ruben J. G., Guido C. Paesen, Thomas A. Bowden, et Xiaohong Shi. 2021. « Recent Advances in Bunyavirus Glycoprotein Research: Precursor Processing, Receptor Binding and Structure ». *Viruses* 13 (2): 353. <https://doi.org/10.3390/v13020353>.
- Hum, Nicholas R., Feliza A. Bourguet, Aimy Sebastian, Doris Lam, Ashlee M. Phillips, Kristina R. Sanchez, Amy Rasley, Gabriela G. Loots, et Dina R. Weilhammer. 2021. « MAVS Mediates a Protective Immune Response in the Brain to Rift Valley Fever Virus ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.22.473954>.
- Ikegami, Tetsuro, Aaron Balogh, Shoko Nishiyama, Nandadeva Lokugamage, Tais B. Saito, John C. Morrill, Vinay Shivanna, et al. 2017. « Distinct Virulence of Rift Valley Fever Phlebovirus Strains from Different Genetic Lineages in a Mouse Model ». *PLoS One* 12 (12): e0189250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189250>.
- Ikegami, Tetsuro, Terence E. Hill, Jennifer K. Smith, Lihong Zhang, Terry L. Juelich, Bin Gong, Olga A. L. Slack, Hoai J. Ly, Nandadeva Lokugamage, et Alexander N. Freiberg. 2015. « Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine Is Fully Attenuated by a Combination of Partial Attenuations in the S, M, and L Segments ». *Journal of Virology* 89 (14): 7262-76. <https://doi.org/10.1128/JVI.00135-15>.
- Ikegami, Tetsuro, et Shinji Makino. 2011. « The Pathogenesis of Rift Valley Fever ». *Viruses* 3 (5): 493-519. <https://doi.org/10.3390/v3050493>.
- Ikegami, Tetsuro, Krishna Narayanan, Sungyong Won, Wataru Kamitani, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2009. « Rift Valley Fever Virus NSs Protein Promotes Post-Transcriptional Downregulation of Protein Kinase PKR and Inhibits EIF2alpha Phosphorylation ». *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000287>.
- Ikegami, Tetsuro, Sungyong Won, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2007. « Characterization of Rift Valley Fever Virus Transcriptional Terminations ». *Journal of Virology* 81 (16): 8421-38. <https://doi.org/10.1128/JVI.02641-06>.
- Jäckel, S., M. Eiden, B. O. EL Mamy, K. Isselmou, A. Vina-Rodriguez, B. Doumbia, et M. H. Groschup. 2013. « Molecular and Serological Studies on the Rift Valley Fever Outbreak in Mauritania in 2010 ». *Transboundary and Emerging Diseases* 60 (s2): 31-39. <https://doi.org/10.1111/tbed.12142>.
- Jackson, Richard J., Christopher U. T. Hellen, et Tatyana V. Pestova. 2010. « The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its

- Regulation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (2): 113-27. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>.
- Jahel, Camille, Maxime Lenormand, Ismaila Seck, Andrea Apolloni, Ibra Toure, Coumba Faye, Baba Sall, et al. 2020. « Mapping livestock movements in Sahelian Africa ». *Scientific Reports* 10 (mai): 8339. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65132-8>.
- Jupp, P. G., A. Kemp, A. Grobbelaar, P. Leman, F. J. Burt, A. M. Alahmed, D. Al Mujalli, M. Al Khamees, et R. Swanepoel. 2002. « The 2000 Epidemic of Rift Valley Fever in Saudi Arabia: Mosquito Vector Studies ». *Medical and Veterinary Entomology* 16 (3): 245-52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2002.00371.x>.
- Kakach, L. T., J. A. Suzich, et M. S. Collett. 1989. « Rift Valley Fever Virus M Segment: Phlebovirus Expression Strategy and Protein Glycosylation ». *Virology* 170 (2): 505-10. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90442-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90442-x).
- Kalveram, Birte, Olga Lihoradova, et Tetsuro Ikegami. 2011. « NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Promotes Posttranslational Downregulation of the TFIIF Subunit P62 ». *Journal of Virology* 85 (13): 6234-43. <https://doi.org/10.1128/JVI.02255-10>.
- Kalveram, Birte, Olga Lihoradova, Sabarish V. Indran, et Tetsuro Ikegami. 2011. « Using Reverse Genetics to Manipulate the NSs Gene of the Rift Valley Fever Virus MP-12 Strain to Improve Vaccine Safety and Efficacy ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 57 (novembre): e3400. <https://doi.org/10.3791/3400>.
- Kalveram, Birte, Olga Lihoradova, Sabarish V. Indran, Nandadeva Lokugamage, Jennifer A. Head, et Tetsuro Ikegami. 2013. « Rift Valley fever virus NSs inhibits host transcription independently of the degradation of dsRNA-dependent Protein Kinase PKR ». *Virology* 435 (2): 415-24. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.031>.
- Kang, Silvia, et Dorian McGavern. 2008. « Lymphocytic choriomeningitis infection of the central nervous system ». *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13 (février): 4529-43. <https://doi.org/10.2741/3021>.
- Kärber, G. 1931. « Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche ». *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 162 (4): 480-83. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>.
- Kasiiti, Jacqueline, Absolomon Kihara, Abuu Oriko, Leonard Okutoyi, James Wauna, David Tchouassi, Caroline Tigoi, Stephen Kemp, Rosemary Sang, et Rees Mbabu. 2014. « Detection of Rift Valley Fever Virus Interepidemic Activity in Some Hotspot Areas of Kenya by Sentinel Animal Surveillance, 2009-2012 ». *Veterinary medicine international* 2014 (août): 379010. <https://doi.org/10.1155/2014/379010>.
- Katen, Sarah, et Adam Zlotnick. 2009. « Chapter 14 The Thermodynamics of Virus Capsid Assembly ». *Methods in enzymology* 455 (février): 395-417. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04214-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04214-6).
- Klemm, Carolin, Juan Reguera, Stephen Cusack, Florian Zielecki, Georg Kochs, et Friedemann Weber. 2013. « Systems to Establish Bunyavirus Genome Replication in the Absence of Transcription ». *Journal of Virology* 87 (14): 8205-12. <https://doi.org/10.1128/JVI.00371-13>.

- Koch, Jana, Qilin Xin, Nicole D. Tischler, et Pierre-Yves Lozach. 2021. « Entry of Phenuiviruses into Mammalian Host Cells ». *Viruses* 13 (2): 299. <https://doi.org/10.3390/v13020299>.
- Koehler, Jeffrey W., Jeffrey M. Smith, Daniel R. Ripoll, Kristin W. Spik, Shannon L. Taylor, Catherine V. Badger, Rebecca J. Grant, et al. 2013. « A Fusion-Inhibiting Peptide against Rift Valley Fever Virus Inhibits Multiple, Diverse Viruses ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002430>.
- Korber, Bette, Will M. Fischer, Sandrasegaram Gnanakaran, Hyejin Yoon, James Theiler, Werner Abfalterer, Nick Hengartner, et al. 2020. « Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence That D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus ». *Cell* 182 (4): 812-827.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>.
- Kortekaas, J., A. Dekker, S. M. de Boer, K. Weerdmeester, R. P. M. Vloet, A. a. C. de Wit, B. P. H. Peeters, et R. J. M. Moormann. 2010. « Intramuscular Inoculation of Calves with an Experimental Newcastle Disease Virus-Based Vector Vaccine Elicits Neutralizing Antibodies against Rift Valley Fever Virus ». *Vaccine* 28 (11): 2271-76. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.001>.
- Kraemer, Moritz U. G., Robert C. Reiner, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Marius Gilbert, David M. Pigott, Dingdong Yi, et al. 2019. « Past and Future Spread of the Arbovirus Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* ». *Nature Microbiology* 4 (5): 854-63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>.
- Kraemer, Moritz U. G., Marianne E. Sinka, Kirsten A. Duda, Adrian Mylne, Freya M. Shearer, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, et al. 2015. « The Global Compendium of *Aedes Aegypti* and *Ae. Albopictus* Occurrence ». *Scientific Data* 2: 150035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>.
- Kreher, Felix, Carole Tamietti, Céline Gomet, Laurent Guillemot, Myriam Ermonval, Anna-Bella Failloux, Jean-Jacques Panthier, Michèle Bouloy, et Marie Flamand. 2014. « The Rift Valley fever accessory proteins NSm and P78/NSm-GN are distinct determinants of virus propagation in vertebrate and invertebrate hosts ». *Emerging Microbes & Infections* 3 (10): e71. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.71>.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, et Koichiro Tamura. 2018. « MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms ». *Molecular Biology and Evolution* 35 (6): 1547-49. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Lau, Simone, et Friedemann Weber. 2020. « Nuclear pore protein Nup98 is involved in replication of Rift Valley fever virus and nuclear import of virulence factor NSs ». *The Journal of General Virology* 101 (7): 712-16. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001347>.
- Le May, Nicolas, Sandy Dubaele, Luca Proietti De Santis, Agnès Billecocq, Michèle Bouloy, et Jean-Marc Egly. 2004. « TFIIH Transcription Factor, a Target for the Rift Valley Hemorrhagic Fever Virus ». *Cell* 116 (4): 541-50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00132-1).
- Le May, Nicolas, Nicolas Gaudiard, Agnès Billecocq, et Michèle Bouloy. 2005. « The N Terminus of Rift Valley Fever Virus Nucleoprotein Is Essential for Dimerization ». *Journal of Virology* 79 (18): 11974-80. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11974-11980.2005>.

- Lee, V. H. 1979. « Isolation of Viruses from Field Populations of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in Nigeria ». *Journal of Medical Entomology* 16 (1): 76-79. <https://doi.org/10.1093/jmedent/16.1.76>.
- Léger, Psylvia, Marilou Tetard, Berthe Youness, Nicole Cordes, Ronan N. Rouxel, Marie Flamand, et Pierre-Yves Lozach. 2016. « Differential Use of the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis ». *Traffic* 17 (6): 639-56. <https://doi.org/10.1111/tra.12393>.
- Leta, Samson, Tariku Jibat Beyene, Eva M. De Clercq, Kebede Amenu, Crawford W. Revie, et Moritz U G Kraemer. 2018. « Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* ». *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 67 (février): 25-35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>.
- Liang, Bo. 2020. « Structures of the Mononegavirales Polymerases ». *Journal of Virology* 94 (22): e00175-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00175-20>.
- Lillis, A. P., I. Mikhailenko, et D. K. Strickland. 2005. « Beyond Endocytosis: LRP Function in Cell Migration, Proliferation and Vascular Permeability ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (8): 1884-93. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01371.x>.
- Linthicum, K. J., A. Anyamba, C. J. Tucker, P. W. Kelley, M. F. Myers, et C. J. Peters. 1999. « Climate and Satellite Indicators to Forecast Rift Valley Fever Epidemics in Kenya ». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5426): 397-400. <https://doi.org/10.1126/science.285.5426.397>.
- Linthicum, K. J., F. G. Davies, A. Kairo, et C. L. Bailey. 1985. « Rift Valley Fever Virus (Family Bunyaviridae, Genus Phlebovirus). Isolations from Diptera Collected during an Inter-Epizootic Period in Kenya ». *The Journal of Hygiene* 95 (1): 197-209. <https://doi.org/10.1017/s0022172400062434>.
- Liu, Jingyuan, Yulan Sun, Weifeng Shi, Shuguang Tan, Yang Pan, Shujuan Cui, Qingchao Zhang, et al. 2017. « The first imported case of Rift Valley fever in China reveals a genetic reassortment of different viral lineages ». *Emerging Microbes & Infections* 6 (1): e4. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.136>.
- Lo, Modou M., Victor Mbaou, Pascale Sierra, Yaya Thiongane, Mariame Diop, Meritxell Donadeu, et Baptiste Dungu. 2015. « Safety and immunogenicity of Onderstepoort Biological Products' Rift Valley fever Clone 13 vaccine in sheep and goats under field conditions in Senegal ». *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 82 (1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v82i1.857>.
- Logan, T. M., K. J. Linthicum, P. C. Thande, J. N. Wagatoh, G. O. Nelson, et C. R. Roberts. 1991. « Egg Hatching of *Aedes* Mosquitoes during Successive Floodings in a Rift Valley Fever Endemic Area in Kenya ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 7 (1): 109-12.
- López-Gil, Elena, Gema Lorenzo, Esther Hevia, Belén Borrego, Martin Eiden, Martin Groschup, Sarah C. Gilbert, et Alejandro Brun. 2013. « A Single Immunization with MVA Expressing GnGc Glycoproteins Promotes Epitope-Specific CD8<sup>+</sup>-T Cell Activation and Protects Immune-Competent Mice against a Lethal RVFV Infection ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (7): e2309. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002309>.
- Lowen, Anice C., Amanda Boyd, John K. Fazakerley, et Richard M. Elliott. 2005. « Attenuation of Bunyavirus Replication by Rearrangement of Viral Coding and Noncoding Sequences ». *Journal of Virology* 79 (11): 6940-46. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6940-6946.2005>.

- Lozach, Pierre-Yves, Andreas Kühbacher, Roger Meier, Roberta Mancini, David Bitto, Michèle Bouloy, et Ari Helenius. 2011a. « DC-SIGN as a Receptor for Phleboviruses ». *Cell Host & Microbe* 10 (1): 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.007>.
- Lozach, Pierre-Yves, Andreas Kühbacher, Roger Meier, Roberta Mancini, David Bitto, Michèle Bouloy, et Ari Helenius. 2011b. « DC-SIGN as a Receptor for Phleboviruses ». *Cell Host & Microbe* 10 (1): 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.007>.
- Machkovech, Heather M., Jesse D. Bloom, et Arvind R. Subramaniam. 2019. « Comprehensive Profiling of Translation Initiation in Influenza Virus Infected Cells ». *PLOS Pathogens* 15 (1): e1007518. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007518>.
- Madani, Tariq A., Yagob Y. Al-Mazrou, Mohammad H. Al-Jeffri, Amin A. Mishkhas, Abdullah M. Al-Rabeah, Adel M. Turkistani, Mohammad O. Al-Sayed, et al. 2003. « Rift Valley Fever Epidemic in Saudi Arabia: Epidemiological, Clinical, and Laboratory Characteristics ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 37 (8): 1084-92. <https://doi.org/10.1086/378747>.
- Makoschey, Birgit, Emma van Kilsdonk, Willem R. Hubers, Mieke P. Vrijenhoek, Marianne Smit, Paul J. Wichgers Schreur, Jeroen Kortekaas, et Véronique Moulin. 2016. « Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (3): e0004550. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004550>.
- Maluleke, Moabi R., Maanda Phosiwa, Antoinette van Schalkwyk, George Michuki, Baratang A. Lubisi, Phemelo S. Kegakilwe, Steve J. Kemp, et Phelix A. O. Majiwa. 2019. « A Comparative Genome Analysis of Rift Valley Fever Virus Isolates from Foci of the Disease Outbreak in South Africa in 2008-2010 ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (3): e0006576. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006576>.
- Mamy, A.B., Yaghouba Kane, A.S. Arbi, Y. Barry, C. Bernard, Renaud Lancelot, et C. Cêtre-Sossah. 2014. « L'épidémie de fièvre de la Vallée du Rift en Mauritanie en 2012 [Rift Valley fever outbreak in Mauritania in 2012] ». *Revue Africaine de Santé et Productions Animales* 12 (janvier): 169-73.
- Maquart, Marianne, Herve Pascalis, S Abdourohmane, Matthieu Roger, F Abdourahime, Eric Cardinale, et C Etre-Sossah. 2014. « Phylogeographic Reconstructions of a Rift Valley Fever Virus Strain Reveals Transboundary Animal Movements from Eastern Continental Africa to the Union of the Comoros ». *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (septembre). <https://doi.org/10.1111/tbed.12267>.
- Marchetti, Luca, et Britta Engelhardt. 2020. « Immune Cell Trafficking across the Blood-Brain Barrier in the Absence and Presence of Neuroinflammation ». *Vascular Biology* 2 (1): H1-18. <https://doi.org/10.1530/VB-19-0033>.
- Matthaeus, Claudia, et Justin W. Taraska. 2021. « Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.614472>.
- May, Nicolas Le, Zeyni Mansuroglu, Pylvia Léger, Thibaut Josse, Guillaume Blot, Agnès Billecocq, Ramon Flick, Yves Jacob, Eliette Bonnefoy, et Michèle Bouloy. 2008. « A SAP30 Complex Inhibits IFN- $\beta$  Expression in Rift Valley Fever

- Virus Infected Cells ». *PLOS Pathogens* 4 (1): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040013>.
- McElroy, Anita K., et Stuart T. Nichol. 2012. « Rift Valley fever virus inhibits a pro-inflammatory response in experimentally infected human monocyte derived macrophages and a pro-inflammatory cytokine response may be associated with patient survival during natural infection ». *Virology* 422 (1): 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.023>.
- McMillen, Cynthia M., Nitin Arora, Devin A. Boyles, Joseph R. Albe, Michael R. Kujawa, Jeffrey F. Bonadio, Carolyn B. Coyne, et Amy L. Hartman. 2018. « Rift Valley fever virus induces fetal demise in Sprague-Dawley rats through direct placental infection ». *Science Advances* 4 (12): eaau9812. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9812>.
- Meegan, J. M. 1979. « The Rift Valley Fever Epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the Epizootic and Virological Studies ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (6): 618-23. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90004-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90004-x).
- Meegan, James M. 1979. « The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-1978 1. Description of the epizootic and virological studies ». *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (6): 618-23. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90004-X).
- Mehand, Massinissa Si, Farah Al-Shorbaji, Piers Millett, et Bernadette Murgue. 2018. « The WHO R&D Blueprint: 2018 Review of Emerging Infectious Diseases Requiring Urgent Research and Development Efforts ». *Antiviral Research* 159 (novembre): 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.009>.
- Mellquist, J. L., L. Kasturi, S. L. Spitalnik, et S. H. Shakin-Eshleman. 1998. « The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency ». *Biochemistry* 37 (19): 6833-37. <https://doi.org/10.1021/bi972217k>.
- Métras, Raphaëlle, W. John Edmunds, Chouanibou Youssouffi, Laure Dommergues, Guillaume Fournié, Anton Camacho, Sebastian Funk, et al. 2020. « Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (39): 24567-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004468117>.
- Mohamed, A. M., A. M. Ashshi, A. H. Asghar, I. H. A. Abd El-Rahim, A. G. El-Shemi, et T. Zafar. 2014. « Seroepidemiological Survey on Rift Valley Fever among Small Ruminants and Their Close Human Contacts in Makkah, Saudi Arabia, in 2011 ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 33 (3): 903-15. <https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2328>.
- Mondet, Bernard, Amadou Diaïté, Jacques-André Ndione, Assane Fall, Veronique Chevalier, Renaud Lancelot, Magate Ndiaye, et Nicolas Ponçon. 2005. « Rainfall patterns and population dynamics of *Aedes (Aedimorphus) vexans arabiensis*, Patton 1905 (Diptera: Culicidae), a potential vector of Rift Valley Fever virus in Senegal ». *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology* 30 (juillet): 102-6.
- Morrill, John C., Tetsuro Ikegami, Naoko Yoshikawa-Iwata, Nandadeva Lokugamage, Sungyong Won, Kaori Terasaki, Aya Zamoto-Niikura, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2010a. « Rapid Accumulation of Virulent Rift Valley Fever Virus in Mice from an Attenuated Virus Carrying a Single Nucleotide Substitution in the M RNA ». *PLOS ONE* 5 (4): e9986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009986>.

- Mottram, Timothy J., Ping Li, Isabelle Dietrich, Xiaohong Shi, Benjamin Brennan, Margus Varjak, et Alain Kohl. 2017. « Mutational Analysis of Rift Valley Fever Phlebovirus Nucleocapsid Protein Indicates Novel Conserved, Functional Amino Acids ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (12): e0006155. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006155>.
- Moutailler, Sara, Ghazi Krida, Yoann Madec, Michèle Bouloy, et Anna-Bella Failloux. 2010. « Replication of Clone 13, a Naturally Attenuated Avirulent Isolate of Rift Valley Fever Virus, in *Aedes* and *Culex* mosquitoes ». *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10 (7): 681-88. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0246>.
- Mroz, Claudia, Mayada Gwida, Maged El-Ashker, Mohamed El-Diasty, Mohamed El-Beskawy, Ute Ziegler, Martin Eiden, et Martin H. Groschup. 2017. « Seroprevalence of Rift Valley Fever Virus in Livestock during Inter-Epidemic Period in Egypt, 2014/15 ». *BMC Veterinary Research* 13 (1): 87. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0993-8>.
- Mudhasani, Rajini, Julie P. Tran, Cary Retterer, Krishna P. Kota, Chris A. Whitehouse, et Sina Bavari. 2016. « Protein Kinase R Degradation Is Essential for Rift Valley Fever Virus Infection and Is Regulated by SKP1-CUL1-F-Box (SCF)FBXW11-NSs E3 Ligase ». *PLoS Pathogens* 12 (2): e1005437. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005437>.
- Muller, R., J. F. Saluzzo, N. Lopez, T. Dreier, M. Turell, J. Smith, et M. Bouloy. 1995. « Characterization of Clone 13, a Naturally Attenuated Avirulent Isolate of Rift Valley Fever Virus, Which Is Altered in the Small Segment ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53 (4): 405-11. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.405>.
- Mundel, B.\* & Gear James\*\*. 1951. « Rift Valley fever : I : the occurrence of human cases in Johannesburg ». *South African Medical Journal* 25 (44): 797-800. [https://doi.org/10.10520/AJA20785135\\_26477](https://doi.org/10.10520/AJA20785135_26477).
- Nabeth, P, Y Kane, M O Abdalahi, M Diallo, K Ndiaye, K Ba, F Schneegans, A A Sall, et C Mathiot. 2001. « Rift Valley fever outbreak, Mauritania, 1998: seroepidemiologic, virologic, entomologic, and zoologic investigations. » *Emerging Infectious Diseases* 7 (6): 1052-54. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2631907/>.
- Ndiaye, El Hadji, Gamou Fall, Alioune Gaye, Ndeye Sakha Bob, Cheikh Talla, Cheikh Tidiane Diagne, Diawo Diallo, et al. 2016. « Vector competence of *Aedes vexans* (Meigen), *Culex poicilipes* (Theobald) and *Cx. quinquefasciatus* Say from Senegal for West and East African lineages of Rift Valley fever virus ». *Parasites & Vectors* 9 (1): 94. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1383-y>.
- Nei, Masatoshi, et Sudhir Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Ngoshe, Yusuf B., Alida Avenant, Melinda K. Rostal, William B. Karesh, Janusz T. Paweska, Whitney Bagge, Petrus Jansen van Vuren, et al. 2020. « Patterns of Rift Valley Fever Virus Seropositivity in Domestic Ruminants in Central South Africa Four Years after a Large Outbreak ». *Scientific Reports* 10 (1): 5489. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62453-6>.
- Nicolas, Gaëlle, Andrea Apolloni, Caroline Coste, G. R. William Wint, Renaud Lancelot, et Marius Gilbert. 2018. « Predictive Gravity Models of Livestock Mobility in Mauritania: The Effects of Supply, Demand and Cultural Factors ». *PLoS ONE* 13 (7): e0199547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199547>.



- Nielsen, Søren Saxmose, Julio Alvarez, Dominique Joseph Bicout, Paolo Calistri, Klaus Depner, Julian Ashley Drewe, Bruno Garin-Bastuji, et al. 2020. « Rift Valley Fever - Epidemiological Update and Risk of Introduction into Europe ». *EFSA Journal* 18 (3): e06041. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6041>.
- Noderer, William L, Ross J Flockhart, Aparna Bhaduri, Alexander J Diaz de Arce, Jiajing Zhang, Paul A Khavari, et Clifford L Wang. 2014. « Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq ». *Molecular Systems Biology* 10 (8): 748. <https://doi.org/10.15252/msb.20145136>.
- Olschewski, Silke, Stephen Cusack, et Maria Rosenthal. 2020. « The Cap-Snatching Mechanism of Bunyaviruses ». *Trends in Microbiology* 28 (4): 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.12.006>.
- Överby, Anna K., Ralf F. Pettersson, et Etienne P. A. Neve. 2007. « The Glycoprotein Cytoplasmic Tail of Uukuniemi Virus (Bunyaviridae) Interacts with Ribonucleoproteins and Is Critical for Genome Packaging ». *Journal of Virology* 81 (7): 3198-3205. <https://doi.org/10.1128/JVI.02655-06>.
- Oymans, Judith, Paul J. Wichgers Schreur, Lucien van Keulen, Jet Kant, et Jeroen Kortekaas. 2020. « Rift Valley Fever Virus Targets the Maternal-Foetal Interface in Ovine and Human Placentas ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (1): e0007898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007898>.
- Papin, James F., Paulo H. Verardi, Leslie A. Jones, Francisco Monge-Navarro, Aaron C. Brault, Michael R. Holbrook, Melissa N. Worthy, Alexander N. Freiberg, et Tilahun D. Yilma. 2011. « Recombinant Rift Valley fever vaccines induce protective levels of antibody in baboons and resistance to lethal challenge in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (36): 14926-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112149108>.
- Patterson, J L, B Holloway, et D Kolakofsky. 1984. « La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. » *Journal of Virology* 52 (1): 215-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC254508/>.
- Pawęska, Janusz T., Veerle Msimang, Joe Kgaladi, Orienka Hellferscee, Jacqueline Weyer, et Petrus Jansen van Vuren. 2021. « Rift Valley Fever Virus Seroprevalence among Humans, Northern KwaZulu-Natal Province, South Africa, 2018-2019 ». *Emerging Infectious Diseases* 27 (12): 3159-62. <https://doi.org/10.3201/eid2712.210643>.
- Pepin, Michel, Michele Bouloy, Brian H. Bird, Alan Kemp, et Janusz Paweska. 2010. « Rift Valley Fever Virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): An Update on Pathogenesis, Molecular Epidemiology, Vectors, Diagnostics and Prevention ». *Veterinary Research* 41 (6): 61. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010033>.
- Pettersson, Ralf F., et Carl-Henrik Von Bonsdorff. 1987. « Chapter 10 Bunyaviridae ». In *Perspectives in Medical Virology*, édité par M. V. Nermut et A. C. Steven, 3:147-57. Animal Virus Structure. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(08\)70092-2](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(08)70092-2).
- Phoenix, Inaia, Shoko Nishiyama, Nandadeva Lokugamage, Terence E. Hill, Matthew B. Huante, Olga A.L. Slack, Victor H. Carpio, Alexander N. Freiberg, et Tetsuro Ikegami. 2016. « N-Glycans on the Rift Valley Fever Virus Envelope Glycoproteins Gn and Gc Redundantly Support Viral Infection via DC-SIGN ». *Viruses* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/v8050149>.
- Pienaar, Nicolaas J., et Peter N. Thompson. 2013. « Temporal and Spatial History of Rift Valley Fever in South Africa: 1950 to 2011 ». *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 80 (1): 384. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.384>.

- Pittman, P. R., C. T. Liu, T. L. Cannon, R. S. Makuch, J. A. Mangiafico, P. H. Gibbs, et C. J. Peters. 1999. « Immunogenicity of an Inactivated Rift Valley Fever Vaccine in Humans: A 12-Year Experience ». *Vaccine* 18 (1-2): 181-89. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00218-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00218-2).
- Pittman, Phillip R., David McClain, Xiaofei Quinn, Kevin M. Coonan, Joseph Mangiafico, Richard S. Makuch, John Morrill, et Clarence J. Peters. 2016. « Safety and Immunogenicity of a Mutagenized, Live Attenuated Rift Valley Fever Vaccine, MP-12, in a Phase 1 Dose Escalation and Route Comparison Study in Humans ». *Vaccine* 34 (4): 424-29. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.030>.
- Pittman, Phillip R., Sarah L. Norris, Elizabeth S. Brown, Manmohan V. Ranadive, Barbara A. Schibly, George E. Bettinger, Nandadeva Lokugamage, Lawrence Korman, John C. Morrill, et Clarence J. Peters. 2016. « Rift Valley Fever MP-12 Vaccine Phase 2 Clinical Trial: Safety, Immunogenicity, and Genetic Characterization of Virus Isolates ». *Vaccine* 34 (4): 523-30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.078>.
- Pustynnikov, Sergey, Divya Sagar, Pooja Jain, et Zafar K. Khan. 2014. « Targeting the C-Type Lectins-Mediated Host-Pathogen Interactions with Dextran ». *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques* 17 (3): 371-92. <https://doi.org/10.18433/j3n590>.
- Quellec, Jordan, Sara Salinas, Yannick Simonin, et Catherine Cêtre-Sossah. 2021. « Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogenèse ». *Virologie* 25 (5): 263-79. <https://doi.org/10.1684/vir.2021.0919>.
- Reed, Christopher, Kenny Lin, Catherine Wilhelmsen, Brian Friedrich, Aysegul Nalca, Ashley Keeney, Ginger Donnelly, et al. 2013a. « Aerosol Exposure to Rift Valley Fever Virus Causes Earlier and More Severe Neuropathology in the Murine Model, Which Has Important Implications for Therapeutic Development ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (4): e2156. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002156>.
- Rey, Carine, Laurent Guéguen, Marie Sémon, et Bastien Boussau. 2018. « Accurate Detection of Convergent Amino-Acid Evolution with PCOC ». *Molecular Biology and Evolution* 35 (9): 2296-2306. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy114>.
- Rey, Carine, Vincent Lanore, Philippe Veber, Laurent Guéguen, Nicolas Lartillot, Marie Sémon, et Bastien Boussau. 2019. « Detecting adaptive convergent amino acid evolution ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1777): 20180234. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0234>.
- Rissmann, M., M. Eiden, B. O. El Mamy, K. Isselmou, B. Doumbia, U. Ziegler, T. Homeier-Bachmann, B. Yahya, et M. H. Groschup. 2017. « Serological and Genomic Evidence of Rift Valley Fever Virus during Inter-Epidemic Periods in Mauritania ». *Epidemiology & Infection* 145 (5): 1058-68. <https://doi.org/10.1017/S0950268816003022>.
- Ross, Ted M., Nitin Bhardwaj, Stephanie J. Bissel, Amy L. Hartman, et Darci R. Smith. 2012. « Animal Models of Rift Valley Fever Virus Infection ». *Virus Research* 163 (2): 417-23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.023>.
- Rua, Rejane, Jane Y. Lee, Alexander B. Silva, Isabella S. Swafford, Dragan Maric, Kory R. Johnson, et Dorian B. McGavern. 2019. « Infection drives meningeal

- engraftment by inflammatory monocytes that impairs CNS immunity ». *Nature immunology* 20 (4): 407-19. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0344-y>.
- Rua, Rejane, et Dorian B. McGavern. 2018. « Advances in Meningeal Immunity ». *Trends in Molecular Medicine* 24 (6): 542-59. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.04.003>.
- Rusu, Mirabela, Richard Bonneau, Michael R. Holbrook, Stanley J. Watowich, Stefan Birmanns, Willy Wriggers, et Alexander N. Freiberg. 2012. « An Assembly Model of Rift Valley Fever Virus ». *Frontiers in Microbiology* 3: 254. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00254>.
- Ryan, Sean K., Kelly L. Jordan-Sciutto, et Stewart A. Anderson. 2020. « Protocol for Tri-Culture of HiPSC-Derived Neurons, Astrocytes, and Microglia ». *STAR Protocols* 1 (3): 100190. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100190>.
- S, Alhaj. 2019. « An Overview of Sixteen Years Control Program against Rift Valley Fever in Saudi Arabia: A Review Study ». *Insights of Biomedical Research* 3 (octobre). <https://doi.org/10.36959/584/451>.
- Sabin, A. B., et R. W. Blumberg. 1947. « Human Infection with Rift Valley Fever Virus and Immunity Twelve Years after Single Attack ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 64 (4): 385-89. <https://doi.org/10.3181/00379727-64-15803>.
- Saluzzo, J. F., et J. F. Smith. 1990. « Use of Reassortant Viruses to Map Attenuating and Temperature-Sensitive Mutations of the Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine ». *Vaccine* 8 (4): 369-75. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(90\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0264-410x(90)90096-5).
- Samy, Abdallah M., A. Townsend Peterson, et Matthew Hall. 2017. « Phylogeography of Rift Valley Fever Virus in Africa and the Arabian Peninsula ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (1): e0005226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005226>.
- Sanz-Ramos, Marta, Fayna Díaz-San Segundo, Cristina Escarmís, Esteban Domingo, et Noemí Sevilla. 2008. « Hidden Virulence Determinants in a Viral Quasispecies In Vivo ». *Journal of Virology* 82 (21): 10465-76. <https://doi.org/10.1128/JVI.00825-08>.
- Schneider-Poetsch, Tilman, Jianhua Ju, Daniel E. Eyler, Yongjun Dang, Shridhar Bhat, William C. Merrick, Rachel Green, Ben Shen, et Jun O. Liu. 2010. « Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin ». *Nature Chemical Biology* 6 (3): 209-17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>.
- Schreur, Paul J. Wichgers, et Jeroen Kortekaas. 2016a. « Single-Molecule FISH Reveals Non-Selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments ». *PLOS Pathogens* 12 (8): e1005800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005800>.
- Scott, G. R., W. Coackley, R. W. Roach, et N. R. Cowdy. 1963. « Rift Valley Fever in Camels ». *The Journal of Pathology and Bacteriology* 86 (juillet): 229-31. <https://doi.org/10.1002/path.1700860131>.
- Seck, Ismaila, Modou Moustapha Lo, Assane Gueye Fall, Mariane Diop, Mamadou Ciss, Catherine Béatrice Cêtre-Sossah, Coumba Faye, et al. 2022. « Identification of Drivers of Rift Valley Fever after the 2013-14 Outbreak in Senegal Using Serological Data in Small Ruminants ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16 (2): e0010024. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010024>.

- Sen, G. C. 2001. « Viruses and Interferons ». *Annual Review of Microbiology* 55: 255-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.255>.
- Seufi, AlaaEdeeen M., et Fatma H. Galal. 2010. « Role of Culex and Anopheles mosquito species as potential vectors of rift valley fever virus in Sudan outbreak, 2007 ». *BMC Infectious Diseases* 10 (1): 65. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-65>.
- Shabman, Reed S., Thomas Hoenen, Allison Groseth, Omar Jabado, Jennifer M. Binning, Gaya K. Amarasinghe, Heinz Feldmann, et Christopher F. Basler. 2013. « An Upstream Open Reading Frame Modulates Ebola Virus Polymerase Translation and Virus Replication ». *PLoS Pathogens* 9 (1): e1003147. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003147>.
- Shi, Zhong-Dong, Hui Wang, et John M. Tarbell. 2011. « Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Interstitial Flow Mechanotransduction Regulating MMP-13 Expression and Cell Motility via FAK-ERK in 3D Collagen ». *PloS One* 6 (1): e15956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015956>.
- Smith, Darci R., Keith E. Steele, Joshua Shamblin, Anna Honko, Joshua Johnson, Christopher Reed, Maureen Kennedy, Jennifer L. Chapman, et Lisa E. Hensley. 2010. « The Pathogenesis of Rift Valley Fever Virus in the Mouse Model ». *Virology* 407 (2): 256-67. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.016>.
- Smithburn, K. C. 1949. « Rift Valley Fever; the Neurotropic Adaptation of the Virus and the Experimental Use of This Modified Virus as a Vaccine ». *British Journal of Experimental Pathology* 30 (1): 1-16.
- Smithburn, K. C., et A. F. Mahaffy. 1949. « Rift Valley Fever; Accidental Infections among Laboratory Workers ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 62 (2): 213-27.
- Soti, Valérie, Véronique Chevalier, Jonathan Maura, Agnès Bégué, Camille Lelong, Renaud Lancelot, Yaya Thiongane, et Annelise Tran. 2013. « Identifying landscape features associated with Rift Valley fever virus transmission, Ferlo region, Senegal, using very high spatial resolution satellite imagery ». *International Journal of Health Geographics* 12 (mars): 10. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-12-10>.
- Soumaré, P. O. Ly, Caio C. M. Freire, Ousmane Faye, Mawlouth Diallo, Juliana Velasco C. de Oliveira, Paolo M. A. Zanotto, et Amadou Alpha Sall. 2012. « Phylogeography of Rift Valley Fever Virus in Africa Reveals Multiple Introductions in Senegal and Mauritania ». *PLOS ONE* 7 (4): e35216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035216>.
- Sow, Abdourahmane, Ousmane Faye, Yamar Ba, Hampathé Ba, Diawo Diallo, Oumar Faye, Cheikh Loucoubar, et al. 2014. « Rift Valley Fever Outbreak, Southern Mauritania, 2012 ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (2): 296-99. <https://doi.org/10.3201/eid2002.131000>.
- Sow, Abdourahmane, Ousmane Faye, Yamar Ba, Diawo Diallo, Gamou Fall, Oumar Faye, Ndeye Sakha Bob, et al. 2016. « Widespread Rift Valley Fever Emergence in Senegal in 2013-2014 ». *Open Forum Infectious Diseases* 3 (3): ofw149. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw149>.
- Spiegel, Martin, Teresa Plegge, et Stefan Pöhlmann. 2016. « The Role of Phlebovirus Glycoproteins in Viral Entry, Assembly and Release ». *Viruses* 8 (7): 202. <https://doi.org/10.3390/v8070202>.
- Sriwichai, Patchara, Stephan Karl, Yudthana Samung, Suchada Sumruayphol, Kirakorn Kiattibutr, Anon Payakkapol, Ivo Mueller, Guiyun Yan, Liwang Cui, et Jetsumon Sattabongkot. 2015. « Evaluation of CDC Light Traps for Mosquito

- Surveillance in a Malaria Endemic Area on the Thai-Myanmar Border ». *Parasites & Vectors* 8 (décembre): 636. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1225-3>.
- Stoek, Franziska, Yahya Barry, Aliou Ba, Ansgar Schulz, Melanie Rissmann, Claudia Wylezich, Balal Sadeghi, et al. 2022. « Mosquito Survey in Mauritania: Detection of Rift Valley Fever Virus and Dengue Virus and the Determination of Feeding Patterns ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16 (4): e0010203. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010203>.
- Struthers, J. K., R. Swanepoel, et S. P. Shepherd. 1984. « Protein Synthesis in Rift Valley Fever Virus-Infected Cells ». *Virology* 134 (1): 118-24. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90277-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90277-0).
- Taylor, Jignesh, Raja Kittappa, Ketty Leto, Monte Gates, Melodie Borel, Ole Paulsen, Sonia Spitzer, et al. 2013. « Stem Cells Expanded from the Human Embryonic Hindbrain Stably Retain Regional Specification and High Neurogenic Potency ». *Journal of Neuroscience* 33 (30): 12407-22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0130-13.2013>.
- Takehara, K., M. K. Min, J. K. Battles, K. Sugiyama, V. C. Emery, J. M. Dalrymple, et D. H. Bishop. 1989. « Identification of Mutations in the M RNA of a Candidate Vaccine Strain of Rift Valley Fever Virus ». *Virology* 169 (2): 452-57. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90171-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90171-2).
- Takehara, K., S. Morikawa, et D. H. Bishop. 1990. « Characterization of Baculovirus-Expressed Rift Valley Fever Virus Glycoproteins Synthesized in Insect Cells ». *Virus Research* 17 (3): 173-90. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90063-h](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90063-h).
- Takehara, Kazuaki, Shigeru Morikawa, et David H. L. Bishop. 1990. « Characterization of Baculovirus-Expressed Rift Valley Fever Virus Glycoproteins Synthesized in Insect Cells ». *Virus Research* 17 (3): 173-90. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90063-H](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90063-H).
- Tantely, Luciano M., Sébastien Boyer, et Didier Fontenille. 2015. « A Review of Mosquitoes Associated with Rift Valley Fever Virus in Madagascar ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92 (4): 722-29. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0421>.
- Terasaki, Kaori, Birte Kalveram, Kendra N. Johnson, Terry Juelich, Jennifer K. Smith, Lihong Zhang, Alexander N. Freiberg, et Shinji Makino. 2021. « Rift Valley fever virus 78kDa envelope protein attenuates virus replication in macrophage-derived cell lines and viral virulence in mice ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 15 (9): e0009785. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009785>.
- Terasaki, Kaori, Sungyong Won, et Shinji Makino. 2013. « The C-Terminal Region of Rift Valley Fever Virus NSm Protein Targets the Protein to the Mitochondrial Outer Membrane and Exerts Antiapoptotic Function ». *Journal of Virology* 87 (1): 676-82. <https://doi.org/10.1128/JVI.02192-12>.
- Thiongane, Y., J. P. Gonzalez, A. Fati, et J. A. Akakpo. 1991. « Changes in Rift Valley Fever Neutralizing Antibody Prevalence among Small Domestic Ruminants Following the 1987 Outbreak in the Senegal River Basin ». *Research in Virology* 142 (1): 67-70. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(91\)90029-3](https://doi.org/10.1016/0923-2516(91)90029-3).
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et T. J. Gibson. 1994. « CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice ».

- Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-80.  
<https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Tokarev, Andrei A., Aixa Alfonso, et Nava Segev. 2013. *Overview of Intracellular Compartments and Trafficking Pathways*. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7286/>.
- Tomori, O. 1979. « Clinical, Virological and Serological Response of the West African Dwarf Sheep to Experimental Infection with Different Strains of Rift Valley Fever Virus ». *Research in Veterinary Science* 26 (2): 152-59.
- Tomori, O., et O. Kasali. 1979. « Pathogenicity of Different Strains of Rift Valley Fever Virus in Swiss Albino Mice ». *British Journal of Experimental Pathology* 60 (4): 417-22.
- Tran, Annelise, Carlène Trevenec, Julius Lutwama, Joseph Sserugga, Marie Gély, Claudia Pittiglio, Julio Pinto, et Véronique Chevalier. 2016. « Development and Assessment of a Geographic Knowledge-Based Model for Mapping Suitable Areas for Rift Valley Fever Transmission in Eastern Africa ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (9): e0004999.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004999>.
- Turell, M. J., C. L. Bailey, et J. R. Beaman. 1988. « Vector Competence of a Houston, Texas Strain of *Aedes Albopictus* for Rift Valley Fever Virus ». *Journal of the American Mosquito Control Association* 4 (1): 94-96.
- Turell, Michael J., Kenneth J. Linthicum, Lisa A. Patrican, F. Glyn Davies, Alladin Kairo, et Charles L. Bailey. 2008. « Vector Competence of Selected African Mosquito (Diptera: Culicidae) Species for Rift Valley Fever Virus ». *Journal of Medical Entomology* 45 (1): 102-8. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[102:vcosam\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[102:vcosam]2.0.co;2).
- Turell, Michael J., William C. Wilson, et Kristine E. Bennett. 2010. « Potential for North American Mosquitoes (Diptera: Culicidae) to Transmit Rift Valley Fever Virus ». *Journal of Medical Entomology* 47 (5): 884-89.  
<https://doi.org/10.1603/me10007>.
- Valle, Tânia Zaverucha do, Agnès Billecocq, Laurent Guillemot, Rudi Alberts, Céline Gomet, Robert Geffers, Kátia Calabrese, et al. 2010. « A New Mouse Model Reveals a Critical Role for Host Innate Immunity in Resistance to Rift Valley Fever ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 185 (10): 6146-56.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000949>.
- Velden, D. J. van, J. D. Meyer, J. Olivier, J. H. Gear, et B. McIntosh. 1977. « Rift Valley Fever Affecting Humans in South Africa: A Clinicopathological Study ». *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde* 51 (24): 867-71.
- Vignuzzi, Marco, Jeffrey K. Stone, Jamie J. Arnold, Craig E. Cameron, et Raul Andino. 2006. « Quasispecies Diversity Determines Pathogenesis through Cooperative Interactions in a Viral Population ». *Nature* 439 (7074): 344-48.  
<https://doi.org/10.1038/nature04388>.
- Vloet, Rianka P. M., Chantal B. F. Vogels, Constantianus J. M. Koenraadt, Gorben P. Pijlman, Martin Eiden, Jose L. Gonzales, Lucien J. M. van Keulen, Paul J. Wichgers Schreur, et Jeroen Kortekaas. 2017. « Transmission of Rift Valley Fever Virus from European-Breed Lambs to *Culex Pipiens* Mosquitoes ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (12): e0006145.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006145>.

- Wallace, D. B., C. E. Ellis, A. Espach, S. J. Smith, R. R. Greyling, et G. J. Viljoen. 2006. « Protective Immune Responses Induced by Different Recombinant Vaccine Regimes to Rift Valley Fever ». *Vaccine* 24 (49-50): 7181-89. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.041>.
- Walls, Alexandra C., Young-Jun Park, M. Alejandra Tortorici, Abigail Wall, Andrew T. McGuire, et David Veasley. 2020. « Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein ». *Cell* 181 (2): 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Walters, Aaron W., Michael R. Kujawa, Joseph R. Albe, Douglas S. Reed, William B. Klimstra, et Amy L. Hartman. 2019. « Vascular Permeability in the Brain Is a Late Pathogenic Event during Rift Valley Fever Virus Encephalitis in Rats ». *Virology* 526 (janvier): 173-79. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.10.021>.
- Wang, Hao, Agne Alminaité, Antti Vaheri, et Alexander Plyusnin. 2010. « Interaction between Hantaviral Nucleocapsid Protein and the Cytoplasmic Tail of Surface Glycoprotein Gn ». *Virus Research* 151 (2): 205-12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.008>.
- Wang, Tian, Terrence Town, Lena Alexopoulou, John Anderson, Erol Fikrig, et Richard Flavell. 2005. « Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis ». *Nature medicine* 10 (janvier): 1366-73. <https://doi.org/10.1038/nm1140>.
- Wang, Xue, Cuixia Hu, Wei Ye, Jia Wang, Xiaofei Dong, Jie Xu, Xiaorong Li, et al. 2022. « Structure of Rift Valley Fever Virus RNA-Dependent RNA Polymerase ». *Journal of Virology* 96 (3): e01713-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.01713-21>.
- Warimwe, George M., Joseph Gesharisha, B. Veronica Carr, Simeon Otieno, Kennedy Otingah, Danny Wright, Bryan Charleston, et al. 2016. « Chimpanzee Adenovirus Vaccine Provides Multispecies Protection against Rift Valley Fever ». *Scientific Reports* 6 (février): 20617. <https://doi.org/10.1038/srep20617>.
- Warrington, Junie P., Qingmei Shao, Ahsia M. Clayton, Kenji J. Maeda, Ashtin G. Beckett, Michael R. Garrett, et Jennifer M. Sasser. 2022. « Placental Vessel-Associated Microglia/Macrophages Increase in Female Dahl-SS/Jr Rats Independent of Pregnancy History ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (6): 3384. <https://doi.org/10.3390/ijms23063384>.
- Weill, Laure, Elena Shestakova, et Eliette Bonnefoy. 2003. « Transcription Factor YY1 Binds to the Murine Beta Interferon Promoter and Regulates Its Transcriptional Capacity with a Dual Activator/Repressor Role ». *Journal of Virology* 77 (5): 2903-14. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2903-2914.2003>.
- Weingartl, Hana M., Myrna Miller, Charles Nfon, et William C. Wilson. 2014. « Development of a Rift Valley Fever Virus Viremia Challenge Model in Sheep and Goats ». *Vaccine* 32 (20): 2337-44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.066>.
- Weingartl, Hana M., Shunzhen Zhang, Peter Marszal, Alan McGreevy, Lynn Burton, et William C. Wilson. 2014. « Rift Valley Fever Virus Incorporates the 78 KDa Glycoprotein into Virions Matured in Mosquito C6/36 Cells ». *PLoS One* 9 (1): e87385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087385>.
- Wichgers Schreur, Paul J., Nadia Oreshkova, Lucien van Keulen, Jet Kant, Sandra van de Water, Pál Soós, Yves Dehon, Anna Kollár, Zoltán Péntzes, et Jeroen Kortekaas. 2020. « Safety and Efficacy of Four-Segmented Rift Valley Fever Virus in Young Sheep, Goats and Cattle ». *Npj Vaccines* 5 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00212-4>.

- Wichgers Schreur, Paul J., Nadia Oreshkova, Rob J. M. Moormann, et Jeroen Kortekaas. 2014. « Creation of Rift Valley Fever Viruses with Four-Segmented Genomes Reveals Flexibility in Bunyavirus Genome Packaging ». *Journal of Virology* 88 (18): 10883-93. <https://doi.org/10.1128/JVI.00961-14>.
- Wichgers Schreur, Paul J., Judith Oymans, Jet Kant, Sandra van de Water, Anna Kollár, Yves Dehon, Pál Soós, Zoltán Péntzes, Lucien van Keulen, et Jeroen Kortekaas. 2021. « A Single Vaccination with Four-Segmented Rift Valley Fever Virus Prevents Vertical Transmission of the Wild-Type Virus in Pregnant Ewes ». *NPJ Vaccines* 6 (1): 8. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00271-7>.
- Williams, Jacob, et João Pinto. 2012. *Training Manual on Malaria Entomology*.
- Won, Sungyong, Tetsuro Ikegami, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2006. « NSm and 78-Kilodalton Proteins of Rift Valley Fever Virus Are Nonessential for Viral Replication in Cell Culture ». *Journal of Virology* 80 (16): 8274-78. <https://doi.org/10.1128/JVI.00476-06>.
- Sungyong Won, Tetsuro Ikegami, C. J. Peters, and Shinji Makino. 2007a. « NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis ». *Journal of Virology* 81 (24): 13335-45. <https://doi.org/10.1128/JVI.01238-07>.
- Wrapp, Daniel, Nianshuang Wang, Kizzmekia S. Corbett, Jory A. Goldsmith, Ching-Lin Hsieh, Olubukola Abiona, Barney S. Graham, et Jason S. McLellan. 2020. « Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation ». *Science (New York, N.Y.)* 367 (6483): 1260-63. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.
- Wu, Yan, Yaohua Zhu, Feng Gao, Yongjun Jiao, Babayemi O. Oladejo, Yan Chai, Yuhai Bi, et al. 2017a. « Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (36): E7564-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705176114>.
- Yadani, F. Z., A. Kohl, C. Préhaud, A. Billecocq, et M. Bouloy. 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 ». *Journal of Virology* 73 (6): 5018-25.



