THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale n°168 – Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

UMR 1058 Pathogénèse et Contrôle des infections Chroniques et Emergentes (PCCEI, Inserm)

UMR 117 Animal, Santé, Territoires, Risques, Ecosystèmes (ASTRE, Cirad)

Etude des mécanismes de neurovirulence associés à l'infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez l'Homme

Présentée par Jordan QUELLEC
Le 22 Novembre 2024

Sous la direction de Catherine CETRE-SOSSAH et Sara SALINAS

Devant le jury composé de

Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET, Professeure, Université de Montpellier	Présidente du jury
Pierre-Yves LOZACH, Directeur de recherche, INRAe	Rapporteur
Pierre-Emmanuel CECCALDI, Professeur, Université Paris Cité	Rapporteur
Fabien GOSSELET, Professeur, Université d'Artois	Examinateur
Catherine CETRE-SOSSAH, Directrice de recherche, CIRAD	Directrice de thèse
Sara SALINAS, Chargée de recherche, Inserm	Co-directrice de thèse
Yannick SIMONIN, Professeur, Université de Montpellier	Encadrant Invité

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier les rapporteurs de mon jury de thèse, Dr Pierre-Yves Lozach et Pr Pierre-Emmanuel Ceccaldi, d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse, ainsi que de faire le déplacement jusqu'à Montpellier. Je remercie également Fabien Gosselet et Anne-Sophie Gosselin-Grenet pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Ce travail représente beaucoup d'investissement personnel. J'espère que sa lecture vous sera agréable et qu'il sera à la hauteur de vos attentes. Je vous souhaite une bonne lecture.

Au cours de cette thèse, j'ai été accompagné par un excellent comité de suivi de thèse, et je tenais à remercier chaleureusement Sébastien Nisole, Pascal Krejbich-Trotot et Elsa Suberbielle. Vos retours ont été très bénéfiques pour ce travail et vos conseils m'ont permis de développer mes compétences, mais surtout mon identité scientifique. Je vous remercie donc de m'avoir accompagné comme vous l'avez fait vers le scientifique que je deviens petit à petit. Je tiens à remercier tout particulièrement Sébastien Nisole, qui a dépassé son rôle de membre du comité de suivi de thèse pour suivre de loin ce que je devenais, voire même mettre en place ensemble des petits projets, m'aidant ainsi encore dans le développement de mon identité scientifique. Merci à toi, Sébastien, pour tout cela. Ton soutien, même de loin, a toujours été d'une aide précieuse.

Bien évidemment, je remercie très chaleureusement Sara Salinas et Catherine Cêtre-Sossah, qui ont dirigé et supervisé ce projet de mon Master 2 jusqu'à finalement ce manuscrit de thèse. Je vous remercie pour ce projet, pour votre accompagnement et pour avoir supporté mes montages photos, mes angoisses, mes fautes, le Comic Sans MS et mon humour parfois limite en termes de maturité. Sara, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien tout au long de ce projet, pour ces discussions scientifiques passionnantes, ces réflexions sur la vie et, pour finir, pour m'avoir toujours laissé être qui je suis et permis de partager ce que j'avais sur le cœur face aux différentes embûches que tout nouveau scientifique rencontre sur le chemin de la thèse. Merci pour tout, merci de m'avoir pris en entretien pour ce stage, merci de m'avoir guidé jusqu'à ce manuscrit et même plus. Je te souhaite de t'épanouir dans tes futurs projets, tu le mérites. Catherine, merci de m'avoir accueilli dans ce projet et d'y avoir laissé une place pour que je puisse m'y développer en tant que scientifique. Je te remercie pour toutes ces discussions viro-logistiques endiablées, pour ces réflexions et hypothèses enivrantes, merci de m'avoir accompagné jusqu'à la fin de ce projet de thèse, merci de m'avoir aidé à construire mon identité de scientifique, merci pour ton soutien et la confiance que tu me portes. Je te souhaite un avenir ensoleillé où tu continueras ton vol d'Oiseau du Paradis. Je remercie également Yannick Simonin, qui a participé à l'encadrement de ma thèse, notamment sur l'aspect de l'enseignement. Je te remercie de m'avoir laissé une place privilégiée dans tes enseignements, me donnant ainsi l'opportunité de faire des CM dans la cour des grands. Cette expérience a été précieuse pour définir la carrière vers laquelle je vais m'orienter. Je te remercie également pour ton soutien depuis le début de ce projet, un soutien qui a toujours compté.

Il m'est tout bonnement impossible de ne pas vous remercier de tout mon cœur, Aurélie Pédarrieu, Camille Piro-Megy et Jonathan Barthélémy. Mes mentors du laboratoire, qui m'ont formé et accompagné dans les manips tout au long de ce projet de thèse. Je ne peux pas vous

remercier seulement pour votre aide au laboratoire, ce ne serait que révéler la partie visible de l'iceberg ! Je vous remercie du fond du cœur pour votre soutien sans faille, d'avoir toujours été là pour m'écouter me plaindre (parce que j'adore me plaindre) et pour m'avoir toujours soutenu. Vous avez été mes bouées indispensables qui m'ont toujours empêché de me noyer dans ce tumulte qu'est parfois la thèse. Je ne vous remercierai jamais assez et je vous souhaite le meilleur à tous les trois, que votre gentillesse continue d'émerveiller et d'apporter aux autres.

La thèse, c'est une expérience unique où l'on évolue autant sur un petit nuage que dans ses propres abysses. Heureusement, au cours de ce voyage, on rencontre des personnes exceptionnelles avec qui on le partage. Orianne, merci pour ton soutien et ton aide précieuse à toutes les étapes de cette thèse. Bachirou, merci pour tes encouragements sans failles. Florent, merci pour tes conseils, ton soutien, ton aide durant cette dernière année de thèse et pour ce petit voyage à Lens (j'aurais préféré les Bahamas, mais bon, on fait avec ce qu'on a). Merci à toute l'unité PCCEI de m'avoir fait une petite place parmi vous et pour votre enthousiasme dans les Biolympiades, une expérience que j'ai adorée malgré quelques petites tricheries de votre part, mais bon, c'est le sport, hein. Côme, je crois que je te dois beaucoup également, tu as sans aucun doute participé à construire le virologiste que je suis devenu. Merci pour toutes ces discussions, sur la vie, sur la science, sur la virologie. Je te souhaite le meilleur en attendant notre prix Nobel de virologie. Ma petite Célia, des personnes aussi gentilles, ça n'existe que dans les films : merci d'exister dans la vraie vie, merci pour ton soutien et tes conseils durant ces trois ans de travail. Roger, je te dois bien un grand merci pour tes conseils et ton mentorat à chaque étape de ma thèse, que ce soit sur le terrain ou au labo. Florian, merci de m'avoir écouté si souvent me plaindre, chose que je rappelle être une de mes spécialités, et merci d'avoir toujours été irréprochable sur les règles des jeux de société. Lorn, même si tu n'es pas né dans le vénérable 20e siècle, je te remercie également pour nos discussions sur la thèse et je te souhaite le meilleur pour la suite. Maxime, Charlotte et Carla, je suis désolé, mais je vous remercie comme l'unité qu'est devenu notre bureau. Je vous remercie d'avoir participé à l'élaboration d'une ambiance de bureau soutenante, très drôle et parfois même hilarante. Merci pour votre soutien de tous les jours, merci de m'avoir si souvent entendu me plaindre, et surtout, merci d'avoir supporté mes démonstrations de frustration, ma deuxième spécialité.

Bien évidemment, je remercie très chaleureusement les équipes et la direction des deux unités, l'UMR ASTRE et l'UMR PCCEI, pour l'accompagnement des doctorants au cours de leurs projets. Je remercie tout particulièrement Vanessa Daoudi pour son soutien au quotidien et son efficacité administrative sans pareil, ainsi que la direction de l'unité PCCEI pour le prolongement de mon contrat, qui a été une aide précieuse, si ce n'est indispensable, afin de rédiger ce manuscrit dans les meilleures conditions. La science, ça coûte cher, et je remercie donc MUSE (Montpellier University of Excellence), l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et le Dispositif de recherche et d'enseignement en partenariat One Health Océan Indien qui ont permis le financement de ce projet et des travaux réalisés.

Au cours de ce voyage scientifique, j'ai pu rencontrer de formidables personnes qui m'ont été d'une aide précieuse au cours de la préparation ou pendant ce projet. Je remercie donc Mylène, Doriane et Malvina pour leur accompagnement, leur soutien et leur intérêt dans mes premiers pas en tant que scientifique. Merci également à vous avec qui nous avons partagé cette

étape tout aussi musclée qu'était le master ! Merci à Vincent, Sébastien, Solène, Florian et Maud pour ces années et les prochaines. Je voudrais aussi remercier les excellents professeurs que j'ai pu rencontrer au cours de ce cursus et qui m'ont poussé vers ce moment. Tout particulièrement, je tiens à remercier très chaleureusement Yannick Simonin et Anne-Sophie Gosselin-Grenet pour m'avoir partagé leur passion de la virologie. Finalement, ce travail de thèse découle d'une petite étincelle que j'avais dans la tête et que vous avez su raviver. J'espère que ce travail reflètera la qualité de votre partage avec les futures générations de chercheurs et que vous y trouverez également une certaine preuve de votre réussite. Et encore plus loin, il y a toutes ces personnes qui ont connu l'autre chapitre de ma vie, mes collègues du CHU et de l'IFSI, qui ont vu toutes les étapes m'amenant vers ce projet. Je remercie tout particulièrement Marie, Lucie, Kevin, Hafida et Charlène pour m'avoir soutenu depuis le début de ce projet. Merci de m'avoir donné la force de me jeter à l'eau.

Pour ceux qui auront eu le courage de lire tous les remerciements, peut-être aurez-vous noté les allusions subtiles mais un peu lourdingues à la mer. C'est bien évidemment parce que je suis Breton et que je n'ai pas le choix de le faire, mais également une forme d'hommage à toi, Pépé, à toi qui es parti avant que je finisse ce projet. Merci d'avoir été cette source d'inspiration, j'espère que tu en aurais été fier.

Je vous remercie, Papa et Maman, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même. L'idée de vous rendre fiers a toujours été une source de motivation qui m'accompagne depuis si longtemps. Maman, merci de m'avoir appris à ne jamais baisser les bras et à me battre pour ce que je veux. Papa, merci de m'avoir appris à devenir plus fort et à vivre pour réaliser mes rêves. 25 ans plus tard et un regard en arrière vers ce souvenir de la médiathèque : le chemin a été plus tumultueux que prévu, mais j'y suis. Merci pour tout.

Comment ne pas penser à vous, la SAMA, ma famille de toujours ? Vous aussi, vous êtes là depuis le début, et je vous remercie du fond du cœur pour votre soutien et l'inspiration que vous m'avez apportée. Merci de me rendre si fier de nous, merci de me rendre impatient de connaître la suite.

Et voilà, on arrive enfin à ceux que je rêve de remercier depuis tant d'années, ceux dont la voix a influencé directement mes choix. Andy, petit frère, je suis si fier de toi et je ne te remercierai jamais assez d'avoir été l'une des voix qui m'a donné la force de commencer ce projet. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été la source d'inspiration qui m'a permis de me retrouver et de reprendre la route que j'avais finalement toujours rêvée. Merci de m'avoir aidé à réaliser mon rêve. Et pour finir, bien évidemment, merci sans fin à toi, Caroline. Je pourrais t'écrire toute une page, mais tu me connais, je commence à voir un peu flou après toutes ces lignes, et je vais essayer d'être concis. Merci de m'avoir simplement dit « vas-y » ce jour où je t'ai dit que j'avais envie de retourner à la fac, merci de m'avoir soutenu et motivé toutes ces années sans argent mais plein d'espoirs, merci d'avoir eu confiance en moi (à ma place, comme toujours), merci pour ton aide, merci pour ton écoute, mais surtout pour ton intérêt pour mes nouvelles passions. Merci d'être fière de moi, merci de m'avoir aidé à retrouver celui que j'ai toujours voulu être. Sans toi, je n'aurais pas pu aller jusque-là, et sans toi, je ne pourrais pas aller là où nous irons. Merci pour tout.

Sommaire

Remerciements 1
Sommaire 4
Publications et présentations scientifiques 7
Abréviations 9
Listes des figures et tableaux 11
Partie 1 : Introduction bibliographique et objectifs 14
Chapitre 1 : Le système nerveux central 15
I. Le système nerveux, un système biologique complexe. 15
II. Les neurones, l'unité fonctionnelle du système nerveux 17
III. Le SNC et son organisation anatomique spécifique 19
IV. Le SNC et sa grande diversité de cellules 21
1. Les neuroprécurseurs et le renouvellement du tissu nerveux 21
2. Les cellules gliales assurent l'homéostasie du SNC 23
i. Les oligodendrocytes et l'activité axonale 23
ii. Les microglies, la réponse immunitaire et l'activité synaptique 24
iii. Les astrocytes, le couteau suisse homéostasique 25
V. Le SNC, un système biologique isolé par plusieurs barrières cellulaires 26
1. La barrière sang-nerf 27
2. La barrière sang-rétine 28
3. La barrière sang-liquide céphalorachidien 28
4. La barrière hémato-encéphalique 29
VI. L'unité neurovasculaire, une organisation multicellulaire soutenant la BHE 32
Chapitre 2 : Infections virales du système nerveux central 35
I. Généralités sur la neurovirologie et les émergences virales récentes 35
II. Les manifestations neurologiques dues à l'infection par un virus neurotrope 37
III. Les mécanismes de neuroinvasion virale 39
IV. La réponse immunitaire du SNC 41
1. Généralités sur le système immunitaire 41
2. Généralités sur la réponse antivirale 44
3. La réponse immunitaire spécifique du SNC 47
V. La neuroinflammation et les dommages tissulaires d'origine immunitaire 49

Chapitre 3 : Le virus de la fièvre de la vallée du Rift 51
I. La distribution spatio-temporelle du RVFV 52
II. La phylogénie, la structure et le cycle de réplication du RVFV 54
III. Le cycle de transmission du RVFV 58
IV. L'infection de la faune sauvage et des vecteurs par le RVFV 60
V. La physiopathologie associée à l'infection par le RVFV en fonction de l'hôte 61
VI. La pathogénèse du RVFV et les modèles animaux 63
VII. Le diagnostic et les moyens de luttes et de préventions contre la FVR 67
Chapitre 4 : Infection du système nerveux par le RVFV 68
I. La neurovirulence du RVFV chez les modèles animaux 69
i. La neurovirulence du RVFV chez le modèle murin 69
ii. La neurovirulence du RVFV chez les modèles primates non-humains 72
iii. La réponse immunitaire et la neurovirulence du RVFV influencées par NSs ... 74
II. La neurovirulence du RVFV chez l'Homme 76
Objectifs, hypothèses et approches 79
Partie 2 : Etude de la neurovirulence du RVFV chez l'Homme 81
Chapitre 1 : Neurotropisme et neuroinflammation du RVFV 81
I. Exploration *in vitro* des interactions entre RVFV et astrocytes humains 81
II. Article 1: Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes 82
III. Travaux préliminaires sur l'identification du récepteur cellulaire impliqué dans l'internalisation du RVFV par les astrocytes 97
Chapitre 2 : Neuroinvasion du RVFV 99
I. Exploration de l'interaction entre le RVFV et la BHE humaine : vers un potentiel mécanisme de neuroinvasion 99
II. Article 2: Rift Valley fever virus is able to cross the human blood brain barrier *in vitro* by direct infection with no deleterious effect 100
III. Travaux préliminaires sur l'interaction entre la BHE et les leucocytes : du mécanisme de cheval de Troie au recrutement immunitaire 131
Partie 3 : Discussions, hypothèses et perspectives 135
Neuroinvasion du RVFV 135
I. Infection directe de la BHE, atteinte de son intégrité et neuroinflammation 135
II. Facteurs d'origine virale pouvant influencer la neuroinvasion du RVFV 138

III. Neuroinvasion par infection directe des autres barrières cellulaires du SNC accessibles par la voie hématogène 140

IV. Autres mécanismes de neuroinvasion 143

Neurotropisme du RVFV et neuroinflammation 145

I. Neurotropisme, récepteurs cellulaires et facteurs cellulaires de résistance 145

II. Facteurs d'origine virale pouvant influencer la neurovirulence du RVFV 147

III. NSs et inhibition de l'export nucléaire des ARNm 148

IV. L'origine des dommages tissulaires est-elle virale ou immunitaire ? 151

Neurovirulence du RVFV : perspectives à partir des données *in vitro* obtenues ... 153

I. Rôle de la neuroinflammation tardive sur les formes neurologiques 153

II. Conclusions *in vitro* et confirmations *in vivo* 155

III. Impact de la voie de transmission sur la neurovirulence du RVFV : aérosols versus vecteurs 157

IV. Anticipation des formes neurologiques sur le terrain à partir des facteurs d'origine virale modulant la neurovirulence de la souche de RVFV 159

Conclusion générale 160

Références bibliographiques 162

Annexes 197

Annexe 1 : Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogénèse 197

Annexe 2 : La fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Ouest : une pathologie zoonotique avec des conséquences socio-économiques multiples 213

Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 1 "Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes" 223

Annexe 4 : Présentation des résultats liés au neurotropisme et à la neuroinflammation suite à l'infection par le RVFV 227

I. Poster 1 : XXIV^{emes} Journées Francophones de Virologie 227

II. Poster 2 : XXIV^{emes} Journées Francophones de Virologie et 8th European congress for Virology 228

Annexe 5 : Réactifs utilisés pour l'approche *in vitro* d'interférence avec les récepteurs astrocytaires LRP1 et DC-SIGN 229

Annexe 6 : Données supplémentaires de l'article 2 "Rift Valley fever virus is able to cross the human blood brain barrier *in vitro* by direct infection with no deleterious effect" 230

Annexe 7 : Exploration des mécanismes de neuroinvasion par le cheval de Troie et de recrutement des lymphocytes à la BHE infectée par RVFV 234

Publications et présentations scientifiques

Revues

Quellec J, Salinas S, Simonin Y, Cêtre-Sossah C. *Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogenèse* [*Rift Valley fever virus infection : physiopathology and pathogenesis*]. **Virologie** (Montrouge). 2021 Oct 1;25(5):263-279. French. doi: 10.1684/vir.2021.0919 (Annexe 1).

Tinto B, **Quellec J**, Cêtre-Sossah C, Dicko A, Salinas S, Simonin Y. *Rift Valley fever in West Africa: A zoonotic disease with multiple socio-economic consequences.* **One Health**. 2023 Jun 14;17:100583. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100583 (Annexe 2).

Articles de recherche

Quellec J, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C. *Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes.* **Emerg Microbes Infect.** 2023 Dec;12(1):2207672. doi: 10.1080/22221751.2023.2207672.

Quellec J, Pédarrieu A, Cannac M, Nisole S, Marty F.H, Gosselet F, Shimizu F, Kanda T, Cêtre-Sossah C, Salinas S. *Rift Valley fever virus is able to cross the human blood-brain barrier by direct infection without deleterious effect.* **Journal of Virology** (Soumission 07/2024, Acceptation 09/2024).

Zoladek J, Cannac M, Seite M, Davies E, **Quellec J**, Barthelemy J, Gorna K, Desgraupes S, Bribes I, Salinas S, Coulpier M, Arhel N. J, Palmarini M, Simonin Y, Wilson S. J, Nisole S, *Overexpression screen of interferon-stimulated genes identifies MITD1 as a potent inhibitor of flavivirus replication*. **PNAS** (Soumission 08/2024).

Présentations scientifiques

Posters :

Etude des mécanismes inflammatoires associés à l'infection du système nerveux central humain par le virus de la fièvre de la vallée du Rift (vFVR), **Quellec J**, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C., **XXIVèmes Journées francophones de Virologie**, Strasbourg, France, 11-12 Avril 2022 (Annexe 4-I).

Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes, **Quellec J**, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C., **XXVèmes Journées francophones de Virologie**, Institut Pasteur Paris, France, 17-18 Avril 2023 (Annexe 4-II).

Rift Valley fever virus (RVFV) modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes, **Quellec J**, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C., **8th European Congress of Virology 2023**, Gdansk, Poland, 2023, 4-7 May 2023 (Annexe 4-II).

Présentations orales :

Investigation of the inflammatory response induced by a Rift Valley fever virus infection with a specific focus on the central nervous system, **International Virtual Conference 2022 of AITVM (Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine) – STVM (Society of Tropical Veterinary Medicine)**, Young researcher session, 17 May 2022.

Rift Valley fever virus is able to infect human astrocytes, induces an apoptotic pathway and modulates the establishment of the immune response, **Quellec J**, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C., **Montpellier Infection and Immunity Meeting 2022**, University of Montpellier, France, 18-19 October 2022.

Interaction entre le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) et la barrière hémato-encéphalique humaine : lumière sur un possible mécanisme de neuroinvasion, **Quellec J**, Salinas S, Cêtre-Sossah C, **XXVIèmes Journées francophones de Virologie**, Bruxelles, Belgique, 12-14 Avril 2023.

Rift Valley fever virus can cross human blood-brain barrier by direct infection without deleterious effects, **Quellec J**, Salinas S, Cêtre-Sossah C**, ASV (American Society of Virology), 43rd Annual Meeting 2024**, Columbus, USA, 24-28 June 2024.

Abréviations

1-9

4E-SE : *eIF4E sensitivity element*

A

ABC : *ATP-binding Cassette*

Abl2 : ABL proto-oncogène 2

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIM2 : *Absent in melanoma 2*

ALCAM : *Activated leukocyte cell adhesion molecule*

ALR : *AIM2-like receptor*

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

AP-1 : *Activator protein 1*

APOBEC3G : *Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G*

ApoE : *Apolipoprotein E*

ATP : Adénosine triphosphate

ARN(m) : Acide ribonucléique (messager)

AXL : *Tyrosine-protein kinase receptor UFO*

B

BCRP : *Breast cancer resistance protein*

BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BMEC : *Brain microvascular endothelial cells*

BSA : *Bovine serum albumin*

BSLCR : Barrière sang-liquide céphalorachidien

BSN : Barrière sang-nerf

BSR : Barrière sang-rétine

C

CAM : *Cellular adhesion molecule*

CARD9 : *Caspase recruitment domain-containing protein 9*

CCHFV : *Crimean–Congo hemorrhagic fever virus*

CCL : *C-C motif chemokine ligand*

CCR : *C-C chemokine receptor*

CD : *Cluster of differentiation*

CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*

CDK7 : *Cyclin-dependent kinase 7*

cGas : *Cyclic GMP-AMP synthase*

CH25H : *Cholesterol 25-hydroxylase*

CHIKV : *Chikungunya virus*

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CK1 : *Casein kinase 1*

CMV : *Cytomegalovirus*

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

CRM1 : *Chromosomal Maintenance 1*

CUL1 : *Cullin 1*

CXCL : *C-C motif chemokine ligand*

D-E

DAMP : *Damage associated molecular pattern*

DAI : *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors*

DC : *Dendritic cell*

DC-SIGN : *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*

DENV : *Dengue virus*

EBOV : *Ebola virus*

EBV : *Epstein–Barr virus*

EFS : Établissement français du sang

eIF : *Eukaryotic translation initiation factor*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ELM : *Eukaryotic linear motif*

ER : *Endoplasmic reticulum*

EV71 : *Enterovirus 71*

F-H

FVR : Fièvre de la vallée du Rift

GABA : Acide γ-aminobutyrique

Gas6 : *Growth arrest – specific 6*

GLUT1 : *Glucose transporter 1*

GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GRO : *Growth related oncogene*

H2-D1 : *Histocompatibility 2, D region locus 1*

H2-T23 : *Histocompatibility 2, T region locus 23*

HCV : *Hepatitis C virus*

HeV : *Hendra virus*

HLA-DR : *Human leukocyte antigen - D related*

HIV : *Human immunodeficiency virus*

HSV : *Herpes simplex virus*

I

IAV : *Influenza A virus*

ICAM : *Intercellular adhesion molecule*

ICTV : *International committee on taxonomy of viruses*

IFI16 : *Interferon-inducible myeloid differentiation transcriptional activator*

IFIT : *Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats*

IFITM : *Interferon-induced transmembrane protein*

IFN : Interféron

IFNAR : *Interferon-alpha/beta receptor*

IFNGR : *Interferon-gamma receptor*

IFNLR : *Interferon-lambda receptor*

Ig: Immunoglobuline

IGF : *Insulin-like growth factor*

IGR : *Intergenic region*

Ikb : *IkappaB kinase*

IL : Interleukine

ILXR : *Interleukin X receptor*

IRF : *Interferon regulatory factor*

ISG : *Interferon stimulated gene*

ISRE : *Interferon stimulated response element*

J-L

JAK : *Janus kinases*

JAM : *Junctional adhesion molecule*

JCV : *Human polyomavirus 2*

LACV : *La Crosse Virus*

LAMP : *Loop-mediated isothermal amplification*

LCMV : *Lymphocytic choriomeningitis virus*

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDL : *Low-density lipoprotein*

LFA1 : *Lymphocyte function-associated antigen 1*

LGP2 : *Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58*

LGTV : *Langat virus*

LPS : Lipopolysaccharide

LRP1 : *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*

LRPAP : *LDL receptor-related protein-associated protein 1*

L-SIGN : *Liver/lymph node-specific intracellular adhesion molecules-3 grabbing non-integrin*

M

MARP : *Muscle ankyrin repeat protein*

MARV : *Marburg virus*

MAVS : *Mitochondrial antiviral-signaling*

MAYV : *Mayaro virus*

MDA5 : *Melanoma differentiation-associated protein 5*

MERS-CoV : *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*

MMP : *Matrix metalloproteinase*

MOI : *Multiplicity of infection*

MOT : Micro-organismes et toxines

MOV10 : *Mov10 RNA Helicase*

MuV : *Mumps virus*

MV : *Measles virus*

Mx : *MX dynamin like GTPase*

Myd88 : *Myeloid differentiation primary response 88*

N

NAP1 : *Nucleosome assembly protein 1*

NFkB : *Nuclear factor-kappa B*

NiV : *Nipah virus*

NK : *Natural killer*

NGF : *Nerve growth factor*

NLR : *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*

NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

NMMHC-IIA : *Non-muscle myosin heavy-chain IIA*

NO : Monoxyde d'azote

NPEV : *Non-polio enteroviruses*

NS : *Non-structural proteins*

NVU : *Neurovascular Unit*

O-P

OAS2 : *2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 2*

OASL2 : *2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2*

OATP : *Organo anion transporter family*

OMS : Organisation mondiale de la santé

OMSA : Organisation mondiale de la santé animale

ONNV : *O'nyong'nyong virus*

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*

PECAM : *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

P-gp : *Permeability-glycoprotein*

PKR : *Protein kinase R*

PNH : Primate non-humain

PP1 : *Protein phosphatase 1*

PRR : *Pattern recognition receptor*

PS : Phosphatidylsérine

PSGL1 : *P-selectin glycoprotein ligand-1*

R

RABV : *Rabies virus*

Rbx1 : *RING box protein 1*

RIG-1 : *Retinoic acid-inducible gene I*

RIOK3 : *RIO Kinase 3*

RLR : *RIG-1 like receptors*

RNAi : *RNA interference*

RNASEK : *Ribonuclease K*

RNP : Ribonucléoprotéine

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR : *Reverse transcription polymerase chain reaction*

RT-ddPCR : *RT-droplet digital PCR*

RTqPCR : *RT-quantitative PCR*

RVFV : *Rift Valley Fever Virus*

S

SAP30 : *Sin3A-associated protein*

SARS-CoV-2 : *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

sCD40L : *Circulating soluble CD40 ligand*

SELE : Sélectine

SFTSV : *Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus*

Skp1 : *S-phase kinase-associated protein 1*

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SOCS : *Suppressor of cytokine signaling*

STAT : *Signal transducer and activator of transcription*

STING : *Stimulator of interferon genes*

T

TAM : *TYRO3, AXL and MERTK*

TBK1 : *TANK-binding kinase 1*

TBEV : *Tick-borne encephalitis virus*

TCF : *T cell factor 1*

TCID50 : *Tissue culture infection dose 50*

TFIIH : *Transcription factor II H*

TGF : *Transforming growth factor*

TLR : *Toll-Like receptor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TOSV : *Toscana virus*

tPA : *Tissue-type plasminogen activator*

TREX : *Transport export*

TRIF : *TIR domain-containing adaptor inducing interferon-β*

TRIM : *Tripartite motif-containing*

U-Z

UBR4 : *Ubiquitin Ligase E3 Component N-Recognin 4*

USP18 : *Ubiquitin specific peptidase 18*

USUV : *Usutu Virus*

UUKV : *Uukuniemi virus*

VCAM : *Vascular cell adhesion molecule*

VE-Cadherin : *Vascular endothelial cadherin*

VLA-4 : *Very late antigen-4*

vWF : *Von Willebrand factor*

VZV : *Varicella-zoster virus*

WDR7 : *WD repeat domain 7*

Wnts : *Wnt signaling pathway*

WNV : *West Nile virus*

XPB : *Xeroderma pigmentosum type B*

XPD : *Xeroderma pigmentosum type D*

XPO1 : *Exportin 1*

YFV : *Yellow fever virus*

YY1 : *Yin Yang 1*

ZAP : *Zinc-finger antiviral protein*

ZIKV : *Zika virus*

ZO : *Zonula occludens*

Listes des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : Représentation schématique et simplifiée des différents niveaux d'organisation du système nerveux humain 15

Figure 2 : Morphologie des neurones et communication interneuronale 17

Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie de l'encéphale 19

Figure 4 : Représentation de l'organisation structurale de la moelle épinière dans le rachis . 20

Figure 5 : Représentation simplifiée de la lignée cellulaire neuroectodermale 21

Figure 6 : Représentation schématique des activités complémentaires de support à l'activité neuronale et au maintien de l'homéostasie du SNC médiées par les cellules gliales 23

Figure 7 : Représentation schématique des barrières régulant les échanges entre le compartiment sanguin et le SNC..... 26

Figure 8 : Représentation schématique des différents mécanismes régulant le transport cellulaire et les échanges à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le compartiment sanguin et le système nerveux central (SNC) 30

Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire au sein de l'unité neurovasculaire..... 32

Figure 10 : Représentation schématique d'une particule virale et du cycle de réplication viral 35

Figure 11 : Distribution géographique de différents arbovirus à l'échelle du globe (2021)... 36

Figure 12 : Stratégie de neuroinvasion des virus invasifs pour accéder au système nerveux central à partir du système périphérique 39

Figure 13 : Représentation schématique et simplifiée de la réponse immunitaire..... 42

Figure 14 : Représentation schématique de la réponse interféron (IFN) 45

Figure 15 : Les mécanismes de neuroinflammation dans le système nerveux central (SNC) 50

Figure 16 : Distribution spatio-temporelle de la FVR entre 1930 et 2024..... 53

Figure 17 : Particules virales du RVFV obtenues par microscopie électronique à transmission et leur organisation 55

Figure 18 : Cycle de réplication du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) 56

Figure 19 : Représentation schématique de la stratégie d'expression du génome viral..... 57

Figure 20 : Représentation schématique du cycle de transmission biologique du RVFV 58

Figure 21 : Représentation de la cinétique et de la symptomatologie associées à l'infection par le RVFV en fonction de l'espèce 61

Figure 22 : Cycle de multiplication du RVFV chez le modèle murin. 64

Figure 23 : Coupe de cerveau de souris infectée par le RVFV 71

Figure 24 : Coupe d'encéphale de ouistiti commun présentant des neurones infectés par le RVFV)..... 73

Figure 25 : Rôles et interférences du facteur de virulence NSs de RVFV sur les différentes voies et fonctions cellulaires 74

Figure 26 : Foyer de nécrose du parenchyme cérébral associé à une infiltration leucocytaire dans une biopsie cérébrale d'un patient décédé suite à une infection par le RVFV 77

Figure 27 : Le RVFV ne semble pas infecter les astrocytes via les récepteurs LRP1 et DC-SIGN..... 98

Figure 28 : Exploration de la neuroinvasion du RVFV par le mécanisme de cheval de Troie et le recrutement des lymphocytes à la BHE infectée..... 132

Figure 29 : Comparaison *in sillico* de séquences protéiques de la protéine de surface Gn de 3 souches de RVFV..... 139

Figure 30 : Représentation schématisée de l'hypothèse du mécanisme d'inhibition des voies d'exports nucléaires des ARNm par NSs..... 150

Figure 31 : Représentation simplifiée des ARN cellulaires liés à la réponse immunitaire des astrocytes et surexprimées suite à l'infection par le RVFV 152

Figure 32 : Représentation schématique reprenant les hypothèses liées à la neurovirulence humaine du RVFV 161

Figure 33 : Phénotype des cellules dendritiques analysées par cytométrie en flux après l'immunomarquage de la surface cellulaire (gris clair : cellules non marquées, gris foncé : cellules marquées)..... 234

Tableaux

Tableau 1 : Exemples de virus neurotropes capables d'induire une pathologie humaine d'ordre neurologique..... 38

Tableau 2 : Classification taxonomique du RVFV 54

Tableau 3 : Liste des réactifs utilisés pour explorer *in vitro* l'implication des récepteurs LRP1 et DC-SIGN dans le cycle de réplication du RVFV chez les astrocytes 229

Tableau 4 : Récapitulatif des réactifs utilisés dans l'exploration préliminaire du mécanisme de cheval de Troie par le RVFV via les cellules dendritiques infectées 234

Tableau 5 : Jeux d'amorces utilisés pour explorer l'expression des protéines d'adhésion .. 234

Partie 1 : Introduction bibliographique et objectifs

Les virus sont des micro-organismes à mode de vie parasitaire dont l'appartenance au règne du vivant est encore à l'heure actuelle débattue : inerte dans l'environnement, les virus doivent obligatoirement utiliser les ressources et les fonctions cellulaires d'un hôte pour assurer leur cycle biologique[1]. Toutefois, les recherches faites sur les virus enveloppent un large spectre d'approches et de relations à leurs hôtes. En effet, là où les virus sont classiquement considérés comme les parasites pathogènes ultimes, certains virus sont pourtant décrits comme bénéfiques pour leurs hôtes, illustrant alors la complexité des interactions virus-hôtes[1]. Ainsi, afin d'étudier les interactions d'un virus avec son hôte dans toutes leurs dimensions, il est important d'explorer l'ensemble des mécanismes en jeu qui permettent la multiplication du virus ou son contrôle par l'hôte, indépendamment de la pathologie potentiellement induite. De ce fait, l'étude des interactions entre un hôte et un virus dans une relation bidirectionnelle est nécessaire pour comprendre les stratégies virales sous-jacentes. Ces connaissances fondamentales en virologie et notre compréhension des interactions hôtes-virus sont essentielles dans l'élaboration de stratégies de santé publique face à un contexte favorisant les émergences virales. Certains facteurs tels que la mondialisation et le réchauffement climatique bouleversent l'écologie des virus, de leur vecteurs et l'efficacité de leurs transmissions et dissémination[2–4]. Ainsi, l'importance de la recherche en virologie dans les stratégies de santé publique ne fera que se renforcer dans le futur.

Associé à ces émergences virales, il semble que depuis quelques décennies le développement d'encéphalites et de troubles neurologiques d'origines virales ne fassent que s'amplifier[5]. Comprendre les mécanismes associés au développement de formes neurologiques dans ces pathologies virales est nécessaire pour l'élaboration de stratégies de lutte en santé publique. Au cours de ce travail de thèse, les mécanismes de neurovirulence associés au Rift Valley fever virus (RVFV), un virus émergent dont l'infection chez l'Homme peut conduire à des formes neurologiques parfois fatales, ont été explorés. Les objectifs de ces travaux de thèse ont pour but d'améliorer la compréhension des interactions entre le RVFV et le système nerveux central humain afin de mieux prévenir et/ou prendre en charge ces formes graves, tout en contribuant modestement aux connaissances scientifiques fondamentales et globales en neurovirologie. Ce manuscrit de thèse va d'abord aborder le cadre théorique autour de la neurovirologie et du RVFV (Partie 1). Un état de l'art des connaissances sur le système nerveux (Chapitre 1), sur l'infection du système nerveux central (Chapitre 2) puis sur le RVFV (Chapitre 3) a permis d'établir un socle théorique afin d'appréhender les manques de connaissances associés à l'infection du système nerveux central humain (SNC) par le RVFV (Chapitre 4). Les objectifs et les approches utilisées dans cette thèse sont ensuite abordés avant de présenter les résultats expérimentaux (Partie 2) obtenus suite à l'exploration du neurotropisme du RVFV (Chapitre 1) puis de ses mécanismes de neuroinvasion (Chapitre 2). Pour finir, la discussion des résultats obtenus et les perspectives liés à ces travaux sont mis en lien avec la littérature aboutissant à une meilleure compréhension de la neurovirulence humaine du RVFV (Partie 3).

Chapitre 1 : Le système nerveux central

Afin de comprendre et d'appréhender de façon globale les mécanismes d'interactions entre un virus et le système nerveux humain ainsi que leurs possibles conséquences, le chapitre 1 de ce manuscrit a pour but de décrire l'organisation fonctionnelle et structurale de ce système biologique crucial pour le bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme.

I. Le système nerveux, un système biologique complexe.

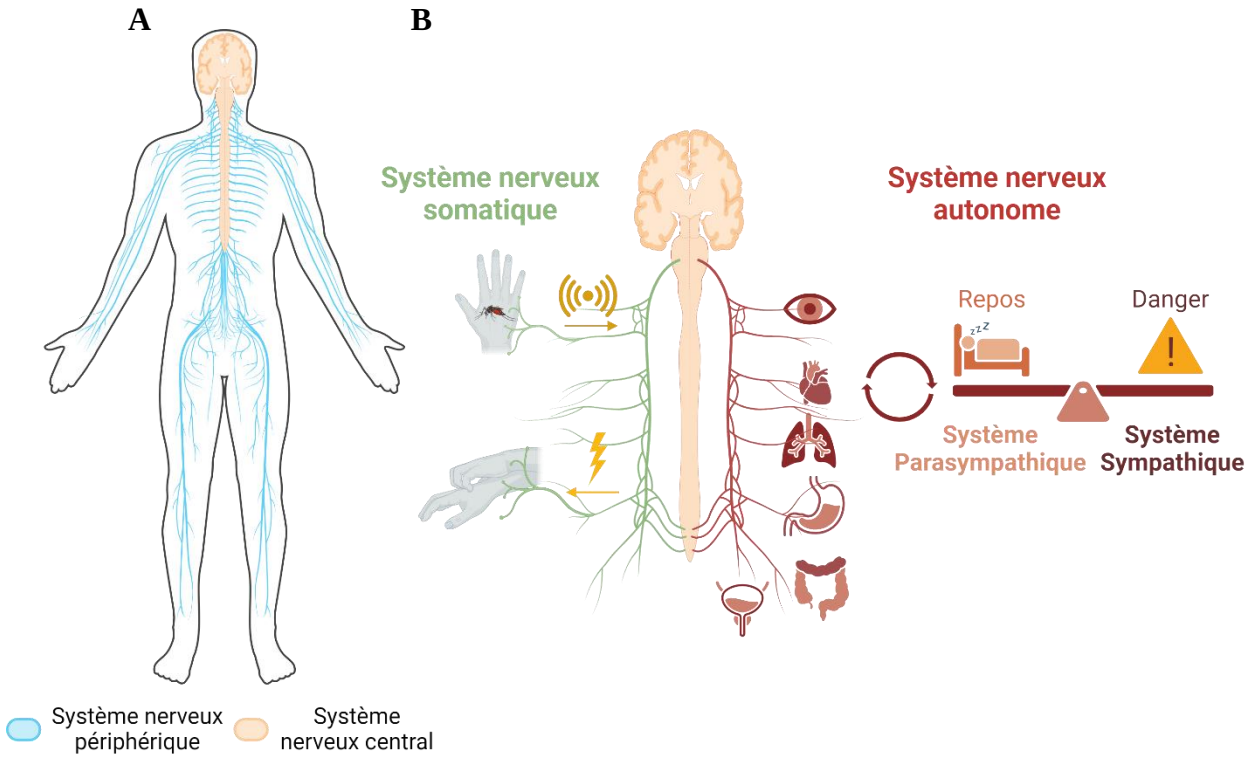


Figure 1 : Représentation schématique et simplifiée des différents niveaux d'organisation du système nerveux humain. A/ Organisation topographique. **B/** Organisation fonctionnelle.

Le système nerveux humain est un système biologique compartimenté et complexe qui permet la régulation de nombreuses fonctions essentielles de l'organisme. En effet, une organisation complexe et une composition particulière du tissu nerveux va permettre le traitement des stimuli internes et externes[6,7]. Divisé en plusieurs systèmes ayant des fonctions et des régulations propres, le système nerveux permet d'interpréter et de réguler l'état de l'organisme en relation avec son environnement, le mouvement de l'organisme ainsi que d'autres fonctions qualifiées de « nobles » telles que la cognition, les émotions, le langage et le raisonnement rationnel[7]. Ainsi, les nombreuses fonctions attribuées au système nerveux sont classiquement regroupées en trois grandes fonctions :

1) La coordination de toutes les fonctions biologiques
2) La relation entre l'organisme et son environnement
3) La cognition et les fonctions « nobles »

Ce système biologique est un système divisé en une collection de cellules, de tissus et d'organes différents dont la coopération permet le bon fonctionnement de l'organisme en fonction des stimuli et des modifications physico-chimiques, physiologiques, internes et externes que celui-ci subit[8]. Dans un premier temps, on parle de division topographique avec la présence d'un système nerveux central (SNC) et d'un système nerveux périphérique (SNP) (Figure 1A). Le SNC est composé de l'encéphale et de la moelle épinière, alors que le SNP correspond aux autres parties du système nerveux qui ne sont pas comprises dans le SNC. Classiquement, le SNP est décrit comme composé essentiellement de ganglions et de nerfs trouvant leurs origines dans le SNC. Le SNP est composé de 43 paires de nerfs : 12 paires de nerfs ayant pour origine l'encéphale (nerfs crâniens) et 31 paires de nerfs ayant pour origine la moelle épinière (nerfs rachidiens)[7,9]. Le SNC est décrit comme le centre de coordination du système nerveux et le SNP comme le système de transmission des signaux entre le SNC et l'organisme.

Dans un second temps, on parle de divisions fonctionnelles avec un système nerveux somatique et un système nerveux autonome (Figure 1B), sans être limité par la division topographique précédemment décrite. Pouvant être sous le contrôle de la volonté, le système nerveux somatique est le système qui va permettre la réception des stimuli externes (son, pression, odeur, lumière) par le système sensitif et qui va également permettre la réponse à ces stimuli, notamment par le système moteur qui est responsable de stimuli permettant le mouvement[7]. On distingue donc ici deux types de messages : les messages ou stimuli afférents, c'est-à-dire allant du nerf vers le SNC, et les messages ou stimuli efférents, c'est-à-dire allant du SNC vers le nerf[6,9].

Contrairement au système nerveux somatique, le système nerveux autonome n'est pas sous le contrôle de la volonté et va permettre la régulation des autres systèmes biologiques de l'organisme, notamment par le biais des nerfs viscéraux qui irriguent l'ensemble des organes et tissus composant le corps humain[6,10]. Ce système joue un rôle clé dans la régulation des fonctions métaboliques et physiologiques, et donc de l'homéostasie globale de l'organisme. Le système nerveux autonome est lui-même sous-divisé fonctionnellement en système sympathique et parasympathique[10,11]. Le système sympathique, principalement composé de nerfs rachidiens, va permettre la régulation autonome des fonctions d'activation ou de danger en adaptant l'organisme à une réponse immédiate à un stress telle qu'une réaction de combat ou de fuite. *A contrario*, le système parasympathique, composé de nerfs crâniens et rachidiens, est associé à la régulation autonome des fonctions de repos et digestion ou de maintien de l'homéostasie. Ainsi, en fonction de la régulation autonome mise en place, le fonctionnement et la régulation des organes et tissus sont différents afin d'adapter métaboliquement l'organisme à la situation rencontrée. Dans une situation de danger, le système sympathique va augmenter la fréquence cardiaque pour augmenter les fonctions métaboliques de l'organisme et ainsi l'adapter à une situation de combat ou de fuite. *A contrario*, en cas de repos, pendant la digestion par exemple, le système parasympathique va diminuer la fréquence cardiaque et réorienter l'activité métabolique de l'organisme vers les fonctions du système digestif[10,11].

II. Les neurones, l'unité fonctionnelle du système nerveux

Véritable Graal de la recherche fondamentale en biologie, le fonctionnement et l'organisation du système nerveux questionnent et intriguent depuis longtemps le monde médical et scientifique. C'est seulement après la description de la cellule comme unité du vivant au 19ème siècle qu'une origine cellulaire à son fonctionnement à commencer à être débattue. Etant donné la complexité morphologique de ce système, c'est seulement au cours du 20ème siècle que son unité fonctionnelle cellulaire a été élucidée : le neurone[7].

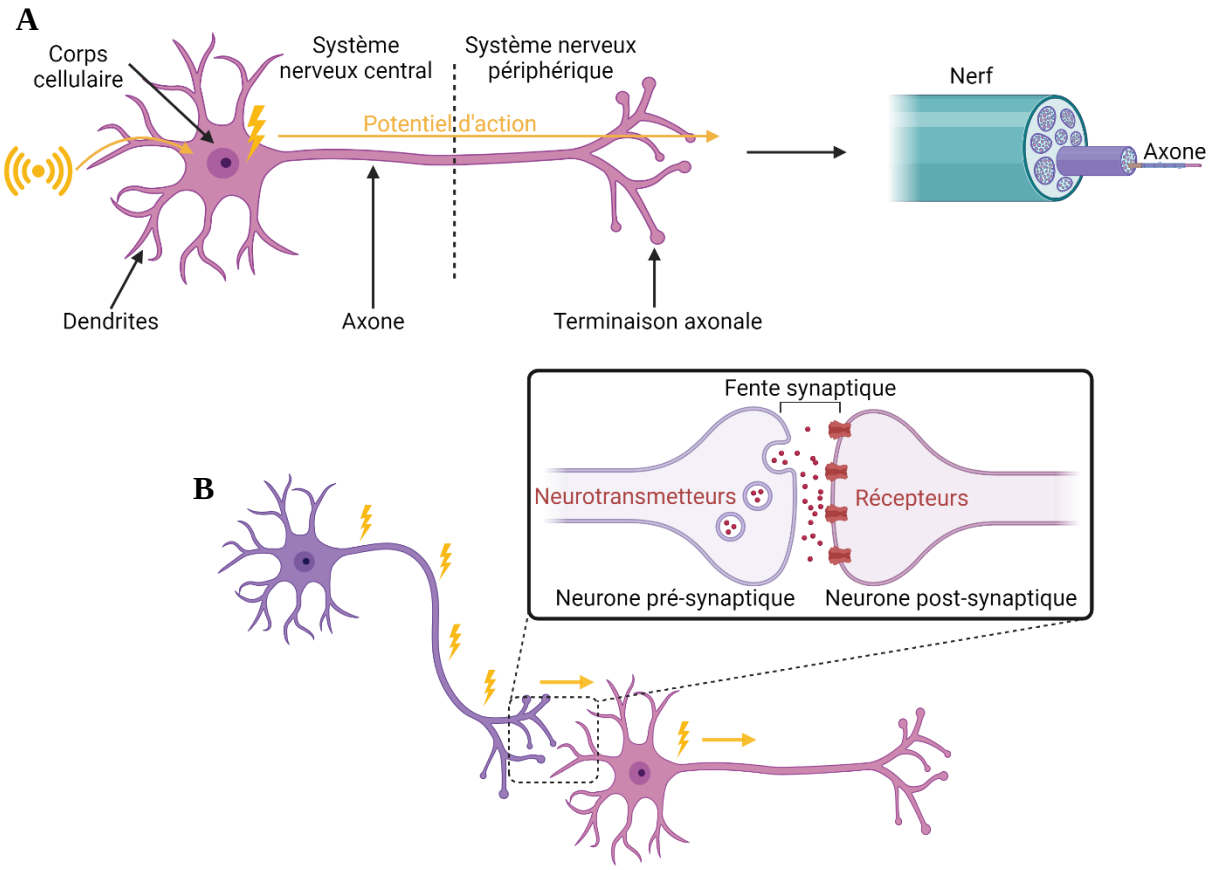


Figure 2 : Morphologie des neurones et communication interneuronale. A/ Représentation schématique de la morphologie d'un neurone et de la transmission d'un message électrique, qualifié de potentiel d'action. Après réception du potentiel d'action par ses dendrites, le neurone va transmettre le potentiel d'action par son axone se prolongeant dans le système nerveux central ou périphérique jusqu'à ses terminaisons axonales innervant sa cible. L'accumulation des différents axones dans le système nerveux périphériques va former des fascicules puis des nerfs. **B/** Représentation simplifiée de la transmission synaptique entre deux neurones : le neurone émetteur ou pré-synaptique (violet) transmet son potentiel d'action par son axone jusqu'à la fente synaptique présente à ses terminaisons axonales. Ce potentiel d'action va être responsable de la libération de neurotransmetteurs par l'axone pré-synaptique. La présence sur les dendrites du neurone post-synaptique (rose) de récepteurs spécifiques aux neurotransmetteurs de la fente synaptique va induire une modification de son état d'excitation et la mise en place d'un potentiel d'action par ce neurone.

Malgré la division du système nerveux en plusieurs systèmes topographiquement et fonctionnellement différents, le neurone est le type cellulaire correspondant à son unité fonctionnelle et structurale[6]. Les neurones sont, en effet, les cellules du système nerveux hautement spécialisées dans l'émission et la réception de messages électriques qui vont permettre les échanges au sein du système nerveux et avec l'ensemble de l'organisme (Figure 2A). Ces messages sont intercellulaires et peuvent, dans certains cas, s'effectuer sur de longues distances au sein de l'organisme[7]. De ce fait, les neurones sont responsables de toutes les

fonctions spécifiques du système nerveux qui ont été décrites précédemment. En lien avec cette spécialisation cellulaire, les neurones ont plusieurs caractéristiques qui leur sont spécifiques : une morphologie cellulaire particulière (polarisée), une composition membranaire adaptée à la diffusion de signaux électriques, la présence de jonctions intercellulaires adaptées à la diffusion des messages et une importante diversité fonctionnelle[6,7,12].

Les neurones ont donc une morphologie cellulaire spécifique, complexe et très diversifiée. Malgré cette diversité, une morphologie commune peut être décrite pour l'ensemble des neurones : la présence d'un corps cellulaire, classiquement présent dans le SNC mais parfois aussi dans des compartiments périphériques tels que la rétine, et de deux types de prolongements cellulaires : les axones et les dendrites[6,7,13]. Les axones permettent la diffusion des messages des neurones vers leurs cibles dans l'ensemble du corps et c'est l'accumulation en fascicules des différents axones qui permet la formation des nerfs du SNP[14]. Les dendrites, dont le nombre peut être très important pour certains types de neurones, permettent la réception des signaux vers le neurone (Figure 2A). Les tissus nerveux du SNC composés majoritairement du corps cellulaire des neurones et de leur arborescence dendritique sont qualifiés de matière grise alors que les tissus composés majoritairement des axones sont qualifiés de matière blanche[6,7].

Une autre caractéristique spécifique des neurones est la présence de jonctions intercellulaires ainsi qu'une composition membranaire adaptée à la diffusion intra- et intercellulaire de messages électriques. La diffusion des messages entre neurones est médiée par un mécanisme de potentiel d'action lié à une capacité intrinsèque d'excitation qui est une fonction caractéristique des neurones[6]. En effet, initié au niveau du corps cellulaire, le message est créé à l'aide d'un différentiel chimique à la membrane se manifestant par une vague auto-régénérante d'activité électrique qui va se propager le long de la membrane de l'axone jusqu'à ses terminaisons axonales innervant sa cible[7,8]. Ce potentiel d'action va alors être transmis à la cible innervée par un processus qualifié de transmission synaptique (Figure 2B). Ce processus extra-cellulaire a lieu dans un espace d'interaction sans contact physique entre l'axone de la cellule émettrice, ou pré-synaptique, et la cellule réceptrice ou post-synaptique (dendrites du neurone par exemple). Cet espace est qualifié de fente synaptique et permet le transfert intercellulaire du message : l'acheminement du potentiel d'action jusqu'à l'extrémité pré-synaptique de la cellule émettrice active les organelles de sécrétions de celle-ci qui vont conduire à la libération dans cet espace extra-cellulaire de molécules appelées neurotransmetteurs. Ces derniers sont de natures très diverses et sont impliqués dans des réponses spécifiques[8]. Une fois dans la fente synaptique, ces neurotransmetteurs vont interagir avec des récepteurs membranaires de la cellule post-synaptique et induire la modification de ses propriétés électriques et ainsi transférer le message électrique initial[7]. Les neurones ne fonctionnent jamais de manière isolée et la fonction d'un neurone est définie par la complexité de ses interactions avec les autres neurones : on parle d'un fonctionnement en réseau qui permet la réception d'un signal spécifique et la mise en place de la réponse adaptée. Ainsi, la fonction d'un neurone est définie par le réseau auquel il appartient. L'ensemble des réseaux neuronaux qui sont associés à une même fonction est qualifié de système neural. La complexité et la diversité de ces systèmes neuraux permettent l'ensemble des fonctions du système nerveux[6,7,9].

Une dernière particularité très importante de ce type cellulaire est que les neurones matures ont une capacité quasi-inexistante de multiplication cellulaire, ce qui les qualifie de cellules amitotiques[6,15]. De même, la génération de nouveaux neurones, ou neurogénèse, dans l'organisme adulte est un processus médié par les neuroprécurseurs. Or, ce processus semble limité et spécifique à certaines régions du SNC[6,16,17]. Après le développement embryonnaire, un mécanisme de résistance à l'apoptose est alors mis en place par les neurones matures afin d'assurer la pérennité des réseaux neuraux mis en place et éviter la neurodégénération[15]. Dans le tissu nerveux mature, l'organisation des cellules ou la compensation des dégâts tissulaires est due principalement à un mécanisme de plasticité neuronale, c'est-à-dire la capacité des neurones à réorganiser leur réseau[18]. L'ensemble de ces caractéristiques (résistance à l'apoptose, neurogénèse limitée, plasticité neuronale) illustrent la fragilité de ce système biologique face à aux dommages tissulaires[6,19].

III. Le SNC et son organisation anatomique spécifique

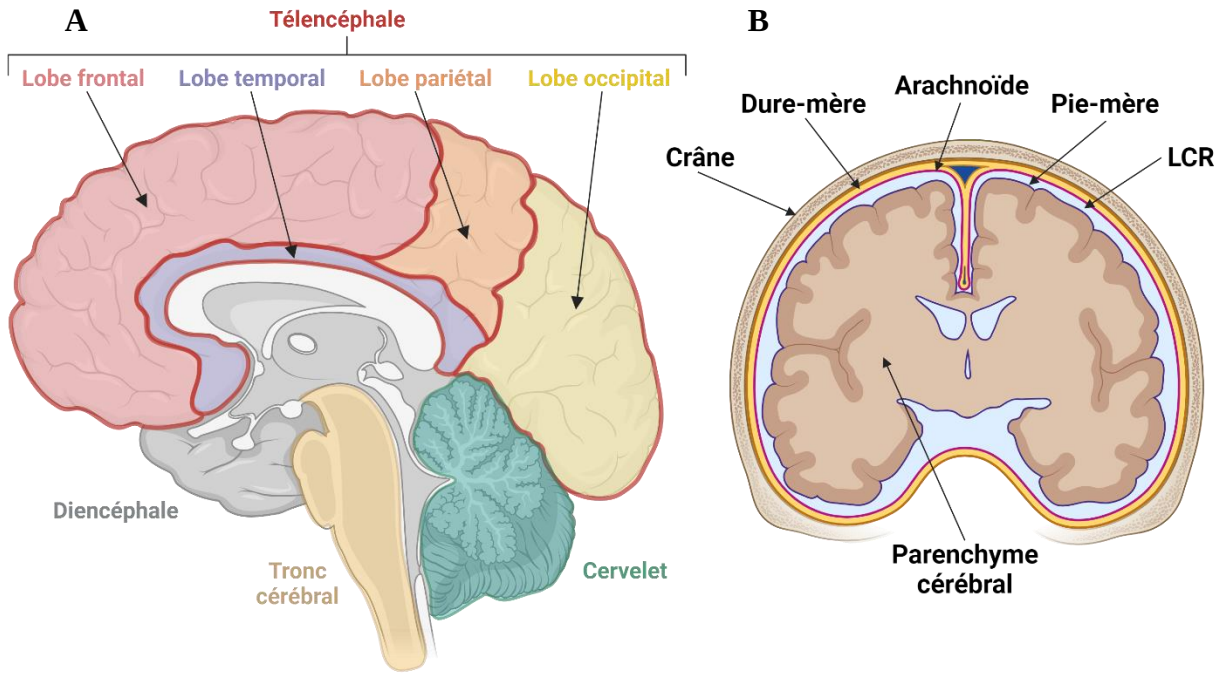


Figure 3 : Représentation schématique de l'anatomie de l'encéphale. A/ Coupe sagittale schématique de l'organisation anatomique de l'encéphale. **B/** Coupe frontale schématique et simplifiée de l'organisation des méninges de l'encéphale. (LCR : liquide céphalo-rachidien)

Le SNC est le compartiment du système nerveux contenu dans l'encéphale (Figure 3A) et la moelle épinière (Figure 4), et ce tissu est appelé parenchyme cérébral. Cependant, dans la littérature actuelle, certains compartiments périphériques sont considérés comme une voie d'entrée privilégiée vers le SNC, ou voire même comme une composante du SNC étant donné la présence de neurones dans ces compartiments. En effet, la rétine et l'épithélium olfactif comportent plusieurs types de neurones et sont parfois considérés comme des éléments du SNC, mais cela reste peu défini[7,20]. Ainsi, dans le reste de ce travail, la rétine et l'épithélium olfactif seront seulement considérés comme des voies privilégiées d'accès au SNC. Communément appelé cerveau, l'encéphale a une organisation complexe et classiquement divisé en 4 parties

distinctes : le tronc cérébral, le cervelet, le diencéphale et le télencéphale[6,8]. Ce dernier correspond aux hémisphères droit et gauche du cerveau, constituant la partie la plus massive de l'encéphale. Le télencéphale est lui-même divisé en 4 lobes : les lobes temporaux, pariétaux, frontaux, et occipitaux[6]. La composition cellulaire ainsi que la répartition matière grise/matière blanche de chacune de ces parties de l'encéphale varient[8]. De même, chaque lobe et chaque partie de l'encéphale sont associées à des fonctions et des régulations différentes[6,8]. Afin d'être protégé, l'encéphale est contenu dans la boite crânienne où il baigne dans un liquide jouant différentes fonctions : le liquide céphalo-rachidien (LCR, Figure 3B). Le LCR apporte une protection mécanique en protégeant le cerveau des chocs, mais il est aussi fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie du SNC[21]. Le LCR est contenu dans les méninges, une membrane protectrice composée de trois tissus conjonctifs différents entourant le SNC : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère[6,21].

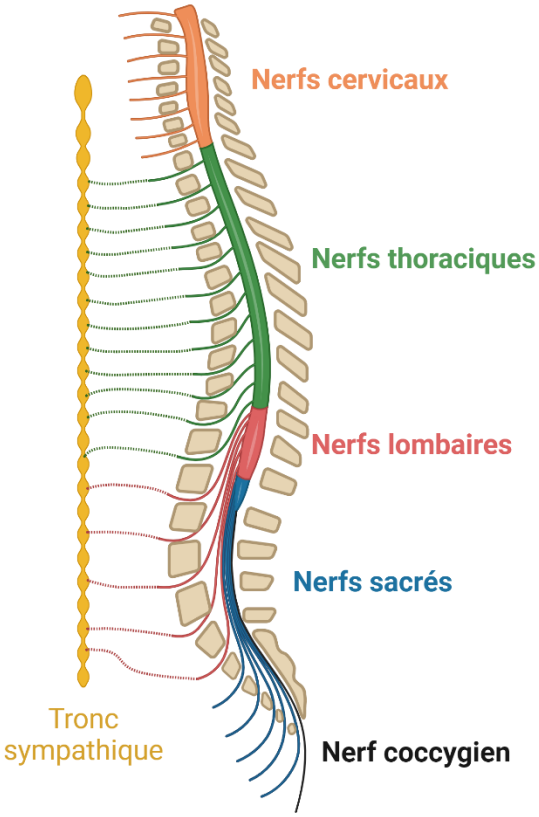


Figure 4 : Représentation de l'organisation structurale de la moelle épinière dans le rachis : nomenclature et position des nerfs rachidiens innervant le tronc sympathique et participant au système nerveux autonome sympathique (lignes indiquées en pointillé)

La moelle épinière est considérée comme l'extension caudale du SNC et donc du parenchyme cérébral. Elle est reliée à l'encéphale grâce à la partie inférieure du tronc cérébral et est contenue dans le rachis, enchâssée entre les vertèbres. La moelle épinière et ses nerfs rachidiens sont segmentés : 8 nerfs cervicaux, 12 paires de nerfs thoraciques, 5 paires de nerfs lombaires, 5 paires de nerfs sacrés et 1 paire de nerfs coccygiens[8]. Ayant une anatomie particulière, la moelle épinière contient également du LCR et est protégée par les méninges. Les neurones de la moelle épinière sont notamment composés de neurones sensitifs et moteurs du système somatique, mais également d'autres neurones appartenant au système autonome sympathique. En effet, les nerfs rachidiens thoraciques et lombaires du système sympathique

sont reliés à une chaine ganglionnaire appelée tronc sympathique, un autre élément du SNP composé de ganglions regroupant les nerfs formant le système autonome sympathique[6].

IV. Le SNC et sa grande diversité de cellules

En lien avec la grande diversité morphologique et fonctionnelle des cellules qui le composent, le parenchyme cérébral est le tissu le plus complexe de l'organisme[7,22]. Ce parenchyme est composé de plusieurs types cellulaires : les neurones, qui sont l'unité de base de ce système biologique, mais également d'autres types cellulaires regroupés sous le terme de cellules gliales[6,7,23]. Ces cellules ont divers rôles et fonctions dont le point commun est le support à l'activité et à la survie des neurones ainsi qu'au maintien de l'homéostasie du SNC[7]. Les cellules gliales représentent la part la plus importante de la masse cellulaire formant le SNC. Un défaut dans l'activité de support de chaque cellule gliale est associé à des troubles du développement du SNC ou à des maladies neurodégénératives[7,23,24]. Ces cellules gliales sont les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies, chacune ayant un rôle spécifique dans le soutien de l'activité neuronale. De plus, des cellules souches, appelées neuroprécurseurs, sont également présentes dans le SNC et permettent la neurogénèse adulte à l'origine du renouvellement et de la réparation partielle du tissu nerveux. Ces cellules ne sont pas communément qualifiées de cellules gliales, mais participent également à l'homéostasie du SNC par cette fonction spécifique. Ainsi, l'ensemble des cellules présentes dans le SNC vont permettre le renouvellement, la survie et le soutien des neurones, mais elles ont des origines, des morphologies et des fonctions qui diffèrent d'un type cellulaire à un autre.

1. Les neuroprécurseurs et le renouvellement du tissu nerveux

Malgré que la neurogénèse adulte soit très limitée au sein du SNC humain, certaines régions du SNC, notamment l'hippocampe présent dans le lobe temporal du télencéphale, sont décrites comme contenant des cellules souches neurales et sont qualifiées de régions neurogéniques[16,17,25–27]. En effet, ces cellules peuvent conduire à la formation par différenciation de l'ensemble des cellules de la lignée neuroectodermale : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Figure 5)[17].

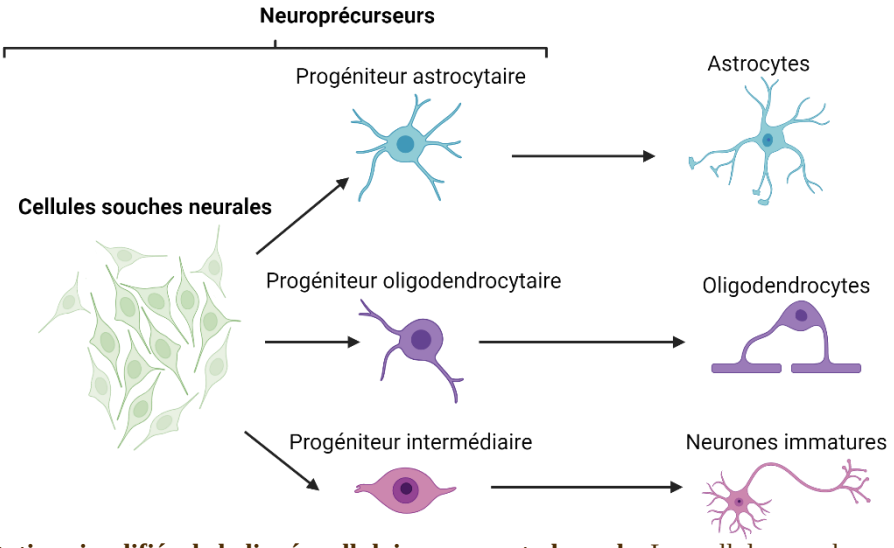


Figure 5 : Représentation simplifiée de la lignée cellulaire neuroectodermale. Les cellules souches neurales présentes dans le SNC vont se différencier en plusieurs neuroprogéniteurs : les cellules souches et les cellules progénitrices sont regroupées sous le terme de neuroprécurseurs. La différenciation de ces neuroprogéniteurs va conduire à la formation des neurones, oligodendrocytes et astrocytes.

Les cellules souches neurales vont se différencier en cellules progénitrices qui vont ensuite se différencier elles-mêmes en cellules spécialisées du SNC. Le terme de neuroprécurseurs correspond aux cellules souches neurales et à leurs différents progéniteurs[17]. On distingue deux types de différenciation des cellules souches neurales :

1) La neurogénèse : correspond à la production de nouveaux neurones. Pour cela, les cellules souches neurales vont se différencier en neuroprogéniteurs, appelés progéniteurs intermédiaires, dont la différenciation va conduire à la formation de neuroblastes puis de neurones immatures[17,28]
2) La gliogénèse : correspond à la production spécifique de cellules gliales suite à la différenciation des cellules souches neurales en deux glioprogéniteurs : les progéniteurs oligodendrocytaires et les progéniteurs astrocytaires. Par leurs différenciations, ces glioprogéniteurs vont conduire à la production d'oligodendrocytes et d'astrocytes[17,28].

Le rôle de prolifération et de différentiation des neuroprécurseurs est qualifié de rôle neurogénique[26]. Ce rôle va permettre la réparation ou la limitation des dégâts tissulaires au sein du SNC en cas de pathologies ou d'atteintes tissulaires[19]. De même, un défaut de prolifération et/ou de différentiation des neuroprécurseurs peut être associé au déclenchement de maladies neurodégénératives ou neurodéveloppementales[26]. Cependant, étant donné la complexité multifactorielle des réseaux neuronaux au sein du SNC, la neurogénèse seule de neurones immatures ne peut suffire à la réparation ou au renouvellement du tissu nerveux. En effet, ces réparations ou renouvellements sont également dépendants de l'intégration fonctionnelle de ce neurone immature dans un réseau de neurones matures. Ainsi, la capacité de réparation d'un compartiment du SNC ne peut être évalué seulement par la présence ou le taux de prolifération des neuroprécurseurs[17].

Par ailleurs, les neuroprécurseurs participent également au maintien de l'homéostasie du SNC par leurs rôles non-neurogéniques. Il a par exemple été décrit que les neuroprécurseurs ont une activité de phagocytose afin d'éliminer les cellules apoptotiques du SNC, et notamment les neuroprogéniteurs apoptotiques. De plus, ces cellules participent activement à la régulation de la réponse immunitaire au sein du SNC, et notamment par une régulation de l'activation des microglies et du recrutement des cellules dendritiques vers le SNC[26,29]. Ainsi, par leurs rôles neurogéniques et non-neurogéniques, les neuroprécurseurs participent activement à la régulation, la survie et le maintien de l'activité des neurones.

2. *Les cellules gliales assurent l'homéostasie du SNC*

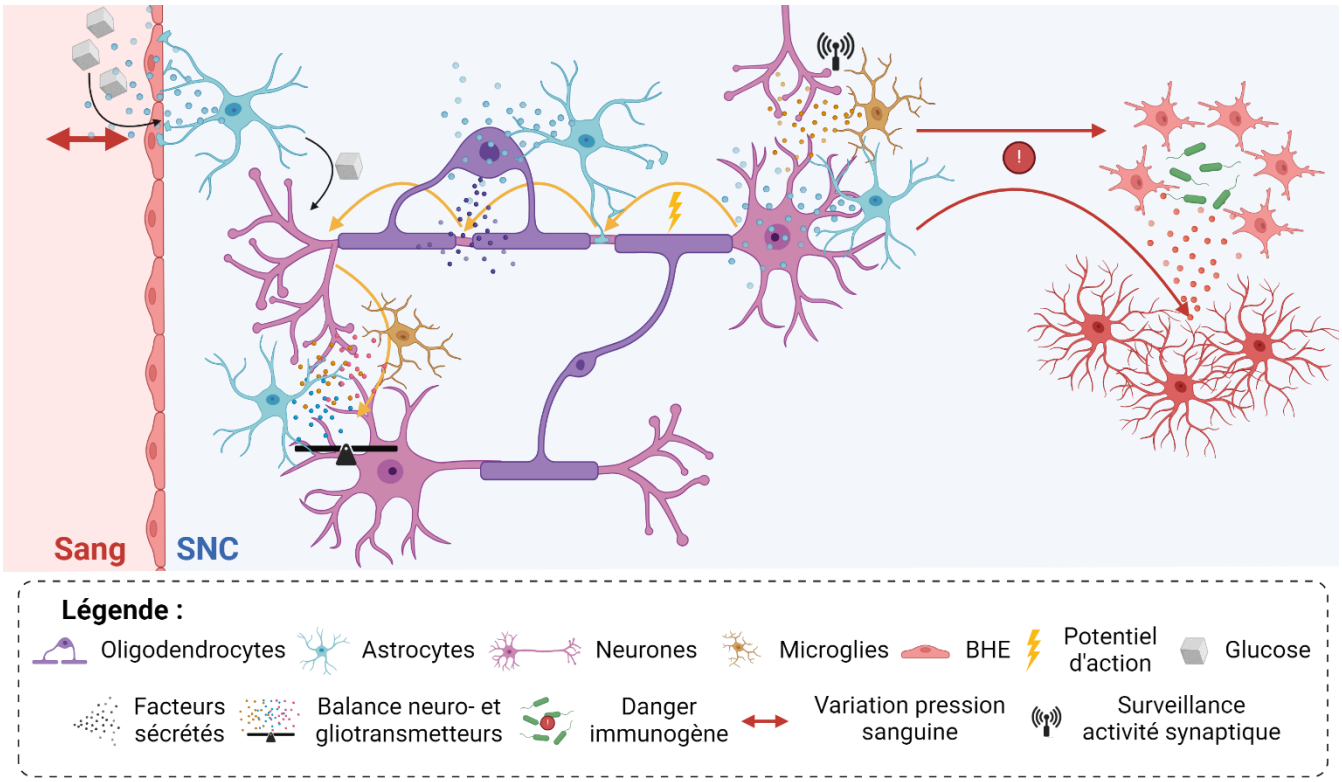


Figure 6 : Représentation schématique des activités complémentaires de support à l'activité neuronale et au maintien de l'homéostasie du SNC médiées par les cellules gliales. (BHE : Barrière hémato-encéphalique, SNC : Système nerveux central)

i. Les oligodendrocytes et l'activité axonale

Comme définie précédemment, l'unité fonctionnelle du SNC est caractérisée par une spécialisation dans l'émission et la réception de messages électriques. Ces messages électriques sont transmis par les neurones grâce à des prolongements cellulaires, les axones. Les axones sont protégés par un mécanisme qualifié de myélinisation conduisant à la formation d'une couche cellulaire protectrice autour des axones appelé gaine de myéline[6,14]. Cette protection des axones a lieu dans le SNC et le SNP. En fonction du compartiment, deux types cellulaires sont décrits comme étant responsables de ce mécanisme de myélinisation : les oligodendrocytes dans le SNC et les cellules de Schwann dans le SNP[14,30,31]. Au sein du SNC, les oligodendrocytes, considérés comme des cellules gliales, vont former des gaines sur plusieurs axones à la fois (jusqu'à 50 dans certaines régions du cerveau)[14,30]. Le mécanisme de myélinisation est spécifique aux différentes régions du SNC, mais est globalement médié par les oligodendrocytes qui vont enrouler leurs projections cellulaires autour de l'axone de façon compacte et former la gaine de myéline. La gaine de myéline est discontinue et séparée par des nœuds de Ranvier qui facilitent la propagation du potentiel d'action[30–34]. De plus, cette connexion entre le corps cellulaire de l'oligodendrocyte et l'axone via la gaine de myéline permet également la mise en place d'un support métabolique et trophique à long-terme des axones favorisant leurs survies, leurs croissances (facteurs de croissance tels que BDNF, NGF, IGF-1, neurotrophines, TGFβ, *etc.*) et leurs activités (ex : apport de lactate permettant la production d'ATP)[32–34]. Par cette connexion avec les axones et la mise en place d'une gaine

protectrice, les oligodendrocytes vont donc jouer un rôle dans le soutien de l'activité axonale des neurones (Figure 6). Il a d'ailleurs été démontré qu'en l'absence des oligodendrocytes, la taille des axones diminuait drastiquement, imageant leurs activités favorisant la protection et la croissance des axones[33]. De ce fait, les oligodendrocytes participent activement à la plasticité neuronale et au renouvellement des réseaux neuronaux au sein du SNC (remplacement des oligodendrocytes quiescents, formation de gaine *de novo* lors de la neurogenèse)[30,32].

ii. Les microglies, la réponse immunitaire et l'activité synaptique

Contrairement aux autres cellules macrogliales (oligodendrocytes, astrocytes), aux neurones et aux neuroprécurseurs, les microglies sont issues de la lignée hématopoïétique périphérique, et ont migré vers le SNC au cours du développement précoce[6,35–37]. De morphologie amiboïde comme les monocytes périphériques lors de leurs entrées dans le SNC, les microglies résidentes du SNC vont se différencier morphologiquement et adopter le phénotype ramifié caractéristique des microglies au repos ou « en surveillance »[38]. Cette morphologie se caractérise par la présence d'un corps cellulaire de petite taille avec de nombreuses et fines projections cellulaires (Figure 6). Les microglies sont les cellules immunitaires majeures du SNC, notamment par leurs activités de phagocytose et régulation immunitaire[39].

Le rôle des microglies ne se cantonne pas à la mise en place et à la régulation de la réponse immunitaire au sein du SNC. En effet, les microglies vont interférer directement et indirectement avec la survie, la croissance et l'activité neuronale. Elles sont impliquées dans des mécanismes d'interactions cellules-cellules directes avec les synapses des neurones afin de réguler l'activité neuronale[36]. Les microglies ont des récepteurs aux neurotransmetteurs sécrétés par les neurones dans les fentes synaptiques, leur permettant ainsi d'évaluer l'activité neuronale[35,40]. Il a été montré que les microglies en état de repos sont des cellules dynamiques dont les projections cellulaires évoluent constamment et surveillent en continu les niveaux de neurotransmetteurs des fentes synaptiques[36,39]. Cette surveillance permet aux microglies de détecter des anomalies dans l'activité des neurones, ce qui peut conduire à leur l'activation[41]. Suite à cette surveillance, les microglies activées vont réguler directement l'activité des neurones en éliminant les neurones surnuméraires ou défectueux, en régulant la synaptogénèse, et en sécrétant des gliotransmetteurs (glutamate) dans la fente synaptique qui vont réguler les niveaux de neurotransmetteurs[35,36,41].

Ces différentes activités de régulation résultent d'une communication importante et à double sens entre les neurones et les microglies. Elles sont activement mises en place au cours du développement précoce, où la neurogénèse est très importante et nécessite une activité de régulation et de nettoyage, mais également au cours de la vie de l'individu lors de dommages ou autres évènements du tissu nerveux conduisant à son réarrangement[36,40]. Ainsi, les microglies sont d'autres acteurs primordiaux de la plasticité neuronale du SNC[40]. Il a également démontré que les microglies participent à la survie des neurones en sécrétant de nombreux facteurs tel que le facteur neurotrophique IGF-1 qui favorise la formation des réseaux neuronaux et leurs survies[36]. Pour résumer, les microglies sont les cellules immunitaires du

SNC, mais leurs rôles dans la réparation tissulaire et l'homéostasie synaptique en font des cellules gliales de soutien cruciales pour l'activité neuronale[36].

iii. Les astrocytes, le couteau suisse homéostasique

Les astrocytes sont les cellules les plus nombreuses du SNC et sont présentes dans l'ensemble du SNC[23,37,42]. Ils ont de nombreux rôles en lien avec la quasi-totalité des processus physiologiques liés au fonctionnement et au maintien de l'homéostasie du SNC (Figure 6)[37]. Tout d'abord, les astrocytes jouent de nombreux rôles au cours du développement précoce du système nerveux. Par exemple, ils participent activement à la formation des réseaux neuronaux, soit en supportant la croissance axonale, soit en supportant l'activité d'élimination des synapses surnuméraires par les microglies[37,42]. Au sein du SNC mature, les astrocytes vont continuer de jouer un rôle majeur dans le maintien de ses fonctions. Cependant, on retrouve différents types d'astrocytes en fonction des interactions cellulaires et de leurs localisations dans le SNC[23,37,42] : les astrocytes protoplasmiques, principalement présents dans la matière grise et en contact avec les synapses neuronales, et les astrocytes fibreux, présents dans la matière blanche et en interaction avec les axones[37,42]. Malgré que certaines fonctions puissent différer entre ces deux types d'astrocytes, il semble toutefois qu'ils partagent de nombreuses fonctions.

Un rôle important des astrocytes est la régulation et le soutien de la communication neuronale. En effet, ils sont associés au nœud de Ranvier et participe au soutien de l'activité axonale en complément de celle des oligodendrocytes[23]. En complément de l'activité des microglies, les astrocytes participent à la synaptogénèse[23]. Afin de protéger les fentes synaptiques, les astrocytes ont des projections membranaires enveloppant cette espace extracellulaire[37]. Par la formation d'une synapse tripartite entre astrocytes, neurones pré-synaptiques et post-synaptiques, les astrocytes répondent aux potentiels d'action des neurones par modification de leurs concentrations calciques intracellulaires et modifient par la suite leur niveau d'expression des gliotransmetteurs (glutamate, purines, GABA, D-Sérine). Ainsi, malgré que les astrocytes soient des cellules non-excitables, c'est-à-dire incapables de propager un potentiel d'action, ils vont tout de même moduler les fluctuations de l'état d'excitation des neurones eux-mêmes[40,42]. Ce processus permet également, en complément de l'activité des microglies, de participer à la régulation de l'homéostasie synaptique. En effet, grâce à la présence massive de transporteurs spécifiques à la membrane de leurs projections cellulaires, les astrocytes limitent l'excitotoxicité par absorption des neurotransmetteurs excédentaires de la fente synaptique. De ce fait, les astrocytes influent directement sur les niveaux de neurotransmetteurs impliqués dans la transmission synaptique[23,37,41,43].

Les astrocytes ont également une activité de support métabolique et trophique importante au sein du SNC, et notamment via leur interaction avec la barrière hémato-encéphalique, point développé plus loin dans ce chapitre. Les astrocytes qui sont en lien avec les vaisseaux sanguins du SNC, vont sécréter différentes molécules qui vont réguler la pression sanguine au sein du SNC et permettre de réguler l'apport de substrat métabolique au SNC (O_2, glucose, nutriments, *etc.*)[42]. Etant également en contact avec les autres cellules du SNC, les astrocytes vont jouer le rôle d'intermédiaires afin de distribuer les nutriments et substrats métaboliques aux différentes cellules tels que le glucose[23,37,42]. De plus, les astrocytes sécrètent

de nombreux facteurs de croissance et de survie, telles que les neurotrophines, favorisant la survie et la croissance des différents types cellulaires au sein du SNC[23,33,42].

Pour finir, en complément de l'activité des microglies, les astrocytes vont jouer un rôle majeur dans la protection et la mise en place de la réponse immunitaire du SNC. Les astrocytes sont en interaction avec plusieurs barrières cellulaires qui maintiennent l'homéostasie du SNC en régulant les échanges entre le sang et le SNC[23]. De même, les astrocytes jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire au sein du SNC par la sécrétion de molécules immunomodulatrices et la formation de cicatrices gliales[37,44,45].

Les astrocytes représentent donc une population très hétérogène de cellules gliales mais leur rôle dans la régulation de l'homéostasie du SNC de façon globale est majeur, ce qui en fait la cellule gliale de soutien primordiale du SNC. Ainsi, il est même décrit que la perte de ces fonctions de support est un facteur clé dans la pathogénèse lors des atteintes pathologiques du SNC[42,46].

V. Le SNC, un système biologique isolé par plusieurs barrières cellulaires

Le système nerveux étant un système biologique crucial pour le bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme, celui-ci est donc hautement protégé face aux agressions extérieures : molécules cytotoxiques endo- ou exogènes, pathogènes, déchets métaboliques, fluctuations physico-chimiques du milieu périphérique, système immunitaire, *etc*[47]. Différentes barrières cellulaires sont présentes afin de réguler finement les échanges entre les différentes parties du système nerveux et les autres compartiments, notamment le compartiment sanguin (Figure 7).

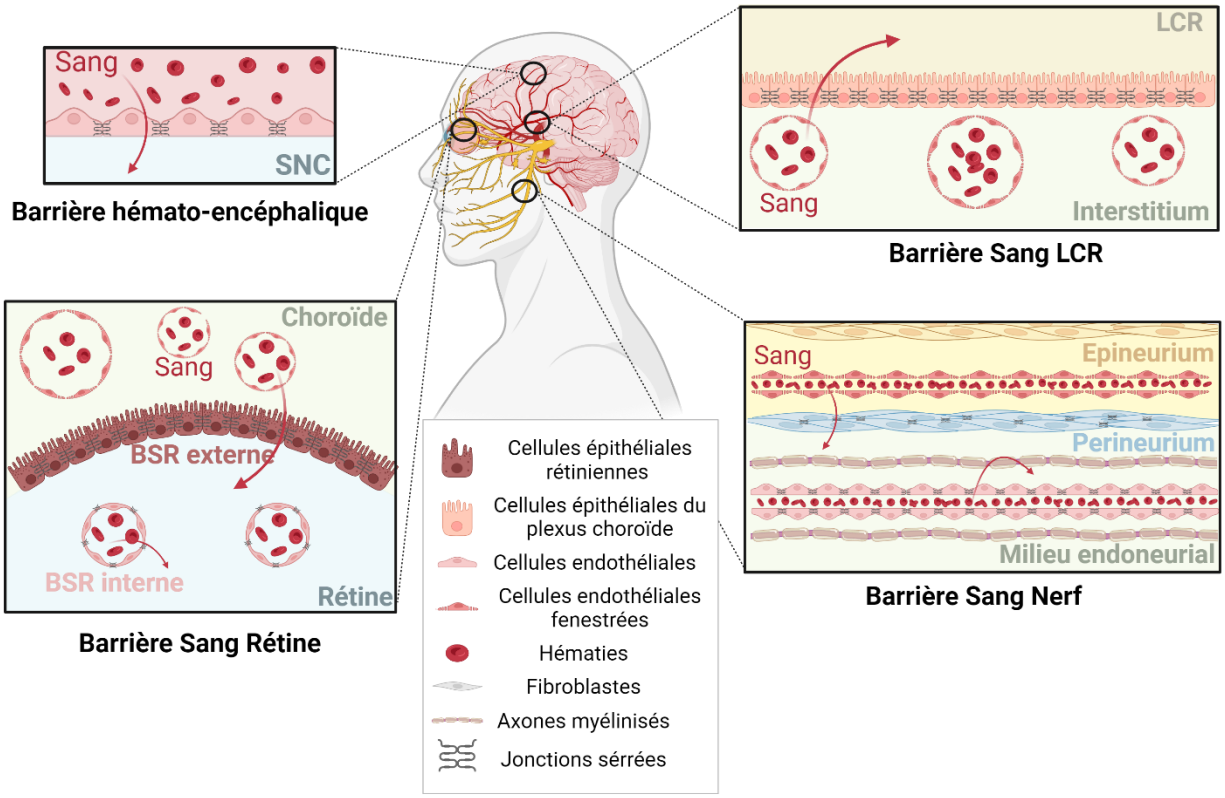


Figure 7 : Représentation schématique des barrières régulant les échanges entre le compartiment sanguin et le SNC. Les flèches rouges représentent le sens par lequel les apports du sang vers le SNC sont régulés. (SNC : système nerveux central, LCR : liquide céphalo-rachidien, BSR : barrière sang rétine)

Le rôle de ces barrières est de réguler les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral à l'aide de caractéristiques spécifiques assurant cette perméabilité sélective : la présence de jonctions serrées inhibant la diffusion passive paracellulaire, une organisation polarisée, une expression polarisée de transporteurs et pompes à efflux cellulaires spécifiques, et la régulation de la transmigration cellulaire notamment dans le contexte de la réponse immunitaire[48]. De même, ces différentes barrières ont également pour rôle d'éliminer les déchets cellulaires et métaboliques du SNC vers le sang. Ces rôles étant essentiels, un défaut fonctionnel de ces barrières est associé à des atteintes neurologiques telles que des pathologies neurodégénératives[48].

1. La barrière sang-nerf

Les axones composant les nerfs étant une projection du SNC vers le SNP, ils doivent également être protégés afin de maintenir l'homéostasie axonale des neurones et par conséquent l'activité neuronale. Les nerfs sont composés de fascicules formés à partir des différents axones myélinisés par les cellules de Schwann, apportant une première protection physique aux axones[14]. Plusieurs axones forment un fascicule, lui-même protégé par une multicouche cellulaire appelée perineurium. Plusieurs fascicules vont être regroupés et être entourés d'une multicouche cellulaire protectrice appelée épineurium (Figure 7). Ces couches cellulaires correspondent à un tissu conjonctif de fibroblastes[14,49]. L'espace formé entre les différents axones dans le perineurium est appelé milieu endoneurial ou endoneurium[49,50]. Les nerfs sont irrigués par des vaisseaux sanguins dans l'épineurium, mais également par des vaisseaux sanguins accédant directement à ce milieu endoneurial, permettant l'apport des facteurs métaboliques et trophiques aux différentes cellules composant le nerf [49,50].

La barrière-sang-nerf (BSN) régulant les échanges entre les nerfs et le compartiment sanguin correspond à l'endothélium vasculaire endoneurial et également à la multicouche cellulaire formant le perineurium[14,49]. Dans un premier temps, l'endothélium endoneurial est très peu fenestré et la localisation de ses pores est localisée à des emplacements spécifiques. Associé à la présence de jonctions serrées, cet endothélium est donc relativement imperméable et limite la diffusion passive et paracellulaire des molécules sanguines. De plus, les échanges entre les capillaires sanguins et le nerf sont hautement régulés par la présence de transporteurs sur ces cellules endothéliales endoneuriales (ex : GLUT-1, permettant le transport de glucose aux nerfs)[49]. Dans un second temps, le perineurium protégeant les fascicules d'axones est un tissu conjonctif très peu perméable, et notamment par son organisation multicouche sans polarité apicobasale et par la présence de jonctions serrées. L'absence de transporteurs cellulaires sur les cellules du perineurium font que le seul mécanisme de diffusion est la diffusion passive paracellulaire, hautement limité dans cette multicouche cellulaire. De même, il a été montré que la majorité des échanges entre le sang et les nerfs se font principalement à travers l'endothélium vasculaire endoneurial et que la diffusion vers le milieu endoneurial à travers le perineurium est négligeable[14,49]. Une atteinte de la BSN et de ses fonctions est décrite comme pouvant conduire à ou majorer des neuropathies du SNP, c'est-à-dire une atteinte de l'activité des nerfs[50].

2. La barrière sang-rétine

La rétine est un tissu de l'œil hautement spécialisé dans la conversion de la lumière visible en signaux électrochimiques transmis aux SNC via les nerfs sensitifs optiques et permettant la vision[49]. La rétine est un tissu situé dans la partie postérieure de l'œil et qui est multicellulaire : il contient des neurones, des vaisseaux sanguins apportant les ressources nutritives et métaboliques à la rétine, des cellules gliales et un épithélium pigmentaire. De même, la rétine est entourée de la choroïde, une couche cellulaire hautement vascularisée dont l'endothélium vasculaire fenestré permet la nutrition de différentes parties de l'œil, dont la rétine[13].

Etant donné la présence de neurones dans ce tissu, la rétine est parfois considérée comme un compartiment du SNC possédant les mêmes protections face aux composés neurotoxiques du sang périphérique, même si cela reste débattu. Ainsi, la barrière sang-rétine (BSR) va réguler les échanges entre la choroïde et la rétine, ainsi qu'entre les vaisseaux sanguins rétiniens et la rétine[51]. On retrouve donc différents tissus formant la BSR et régulant ces échanges par la présence de jonctions serrées entre les cellules et des transporteurs cellulaires spécifiques. La BSR externe est l'épithélium pigmentaire rétinal qui forme une barrière peu perméable et sélective entre la choroïde et la rétine. La BSR interne est l'endothélium vasculaire formant les capillaires sanguins rétiniens qui permettent la régulation très fine des échanges entre le sang et la rétine[13]. Ainsi, par ces deux barrières interne et externe, la BSR va maintenir l'homéostasie au sein de la rétine, un compartiment essentiel assurant une fonction cruciale du système nerveux. Une fois de plus, un défaut dans la fonction barrière de la BSR est associé à des pathologies rétiniennes telles que la formation d'œdème rétiniens ou une dégénération maculaire[13,51].

3. La barrière sang-liquide céphalorachidien

Le LCR est un fluide dynamique circulant dans le SNC et participant au support métabolique et nutritif de celui-ci. En effet, des échanges entre le LCR et les vaisseaux sanguins permettent l'apport vers le SNC de nombreux facteurs métaboliques et trophiques (micronutriments, peptides, hormones, vitamines, facteurs de croissance, neurotrophines) mais aussi de cellules immunitaires. De même, le LCR participe au nettoyage du SNC (protéines toxiques, déchets métaboliques), rôle normalement assuré dans les tissus périphériques par le système lymphatique. Or, le SNC est très peu innervé par le système lymphatique (seulement dans la dure-mère) et le LCR jouerait ce rôle de nettoyage, alors qualifié de système glymphatique du SNC[52,53]. De plus, sous la dure-mère des méninges se trouve un épithélium, appelé arachnoïde, qui forme une autre barrière du SNC mais cette fois-ci avasculaire. Cette barrière va réguler les échanges entre le LCR des méninges et les vaisseaux lymphatiques de la dure-mère[53–55]. Le plexus choroïde forme des microvillosités dans les ventricules du diencéphale et du télencéphale, et est le lieu de production principal du LCR[49]. Une production de LCR et un flux aqueux important sont nécessaires pour permettre la circulation du LCR au sein du SNC et ainsi assurer ses fonctions de nettoyage et de nutrition. Ainsi, l'apport vers le LCR de solutés tels que des ions et de l'eau d'origine plasmatique à partir

des vaisseaux sanguins doit être continu. De ce fait, la circulation du LCR dans le SNC est intimement corrélée à la circulation sanguine[49,56–58].

Les échanges entre le LCR et les vaisseaux sanguins ont principalement lieu au niveau de l'espace subarachnoïdien des méninges et au niveau du plexus choroïde. Cependant, les échanges entre le LCR et le sang permet l'apport de facteurs métaboliques importants, mais permet également le contact avec l'ensemble des composants cytotoxiques du sang. Ainsi, une barrière cellulaire à ces zones de contact régule très finement les échanges entre les vaisseaux sanguins et le LCR. Cette barrière est la barrière sang LCR (BSLCR), une barrière composée d'une bicouche cellulaire et formant une structure épithelio-endothéliale (Figure 7). La première couche de cette barrière est l'endothélium vasculaire des vaisseaux sanguins irriguant le plexus choroïde, un endothélium qualifié d'endothélium choroïdal, très fenestré, possédant peu de jonctions serrées, et perméable au passage des composants du sang[49,56]. Cette première couche permet l'apport de cellules immunitaires et de facteurs métaboliques au niveau d'un espace interstitiel appelé interstitium. Afin de réguler les échanges entre cet espace et le LCR, ce sont les cellules épithéliales du plexus choroïde qui forment la deuxième couche de la BSLCR[52,58]. Cet épithélium monocouche est très sélectif et structuré selon une polarité apicobasale avec une face apicale vers le LCR et une face basolatérale vers l'interstitium[49]. La sélectivité de cet épithélium est liée à la présence de jonctions serrées ainsi que la présence spécifique et polarisée de récepteurs cellulaires[49,56,58]. Au vu de ses différentes fonctions cruciales dans l'homéostasie du SNC, que ce soit par la production de LCR ou son rôle de barrière, il est décrit qu'un défaut fonctionnel de cette barrière est associé à des maladies neurodégénératives du SNC[52,58].

4. La barrière hémato-encéphalique

La neurovascularisation correspondant à l'ensemble des vaisseaux sanguins innervant le système nerveux est essentielle au bon fonctionnement du SNC. En effet, le SNC est un système biologique contenant peu de réserves énergétiques et pourtant très énergivore. De ce fait, un apport sanguin constant et dynamique de métabolites et de nutriments, tels que de l'O_2 ou du glucose, ainsi que l'élimination des déchets métaboliques du SNC, sont nécessaires et assurés par cette neurovascularisation[37,59]. La barrière hémato-encéphalique (BHE) est un endothélium vasculaire dynamique qui va permettre la régulation continue des échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Figure 7)[60–65]. Ainsi, la perméabilité sélective de la BHE constitue une barrière physique jouant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie du SNC[54,60]. Les cellules endothéliales microvasculaires de la BHE ont un rôle central dans cette fonction barrière. En effet, contrairement aux cellules endothéliales de la vascularisation périphérique, les cellules endothéliales de la BHE forment un endothélium spécifique arborant des caractéristiques fonctionnelles, morphologiques et structurales qui leurs sont propres (Figure 8)[54,59,61,66,67] :

1) L'expression de protéines de jonctions intercellulaires, notamment des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence, conférant la fonction barrière à cet endothélium ainsi qu'une polarité apicobasale en séparant le pôle apical (sang) et le pôle basolatéral (parenchyme nerveux)[54,61,68,69].

2) L'absence de fenestration dans l'endothélium vasculaire.
3) L'absence d'activité de pinocytose.
4) La mise en place d'un transport cellulaire hautement sélectif par l'expression de transporteurs cellulaires actifs et spécifiques qui vont réguler les influx des substances nutritives et essentielles au métabolisme du SNC, ainsi que les efflux des substances potentiellement neurotoxiques (déchets métaboliques, …) vers le sang[54,61,62].

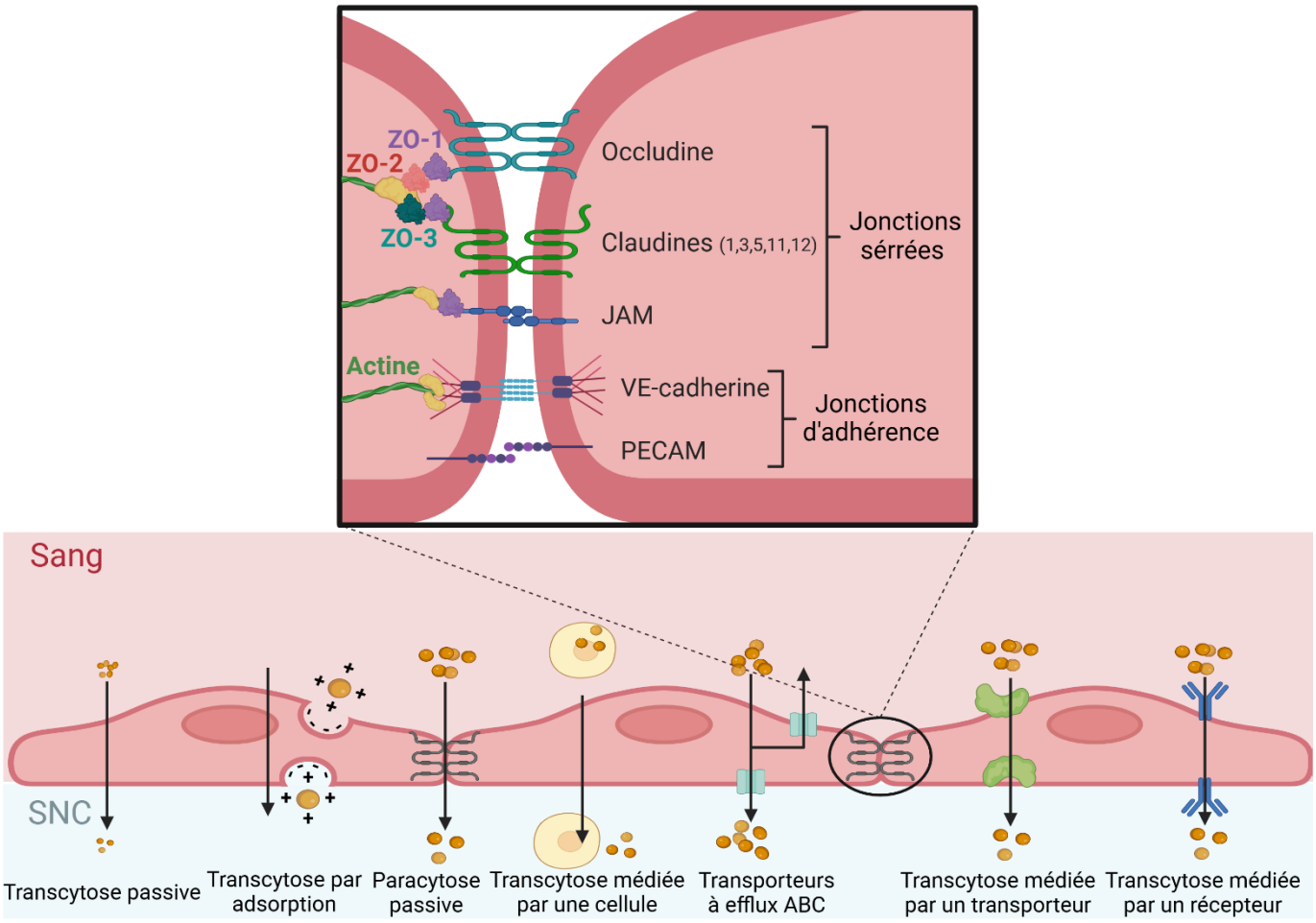


Figure 8 : Représentation schématique des différents mécanismes régulant le transport cellulaire et les échanges à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le compartiment sanguin et le système nerveux central (SNC). Le cercle noir représente un focus sur les jonctions cellulaires (jonctions serrées et d'adhérences) permettant à la BHE d'être imperméable et d'inhiber la diffusion paracellulaire passive. (ABC : ATP-Binding Cassette, ZO : Zonula occludens, JAM : Junctional adhesion molecule, PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule, VE : vascular endothelium)

La fonction barrière et la perméabilité sélective de la BHE sont dues à la présence de jonctions cellulaires spécifiques et à la mise en place d'un transport cellulaire sélectif. Les jonctions intercellulaires vont permettre la mise en place d'une perméabilité sélective par la BHE. En effet, l'organisation des protéines de jonctions intercellulaires en complexe de jonction permet la formation de l'endothélium selon une organisation apicobasale et limite la diffusion paracellulaire passive[49,54,60,62,70]. Ces complexes de jonctions sont formés de protéines de jonctions serrées et de protéines d'adhérence[54]. Les protéines de jonctions serrées sont composées de 4 familles de protéines membranaires et chacune de ces protéines va jouer des rôles différents dans la mise en place des jonctions serrées :

1) Les claudines (1, 3, 5, 11 et 12) sont des protéines de jonctions serrées composées de 4 domaines transmembranaires et sont le composant majeur des jonctions serrées de la BHE, notamment les claudines 1 et 5. Leur interaction est homotypique et médiée par leur domaine extracellulaire présent à la membrane des cellules adjacentes[14,71]. Ce sont ces protéines de jonctions serrées qui sont responsables de la faible perméabilité de la BHE[72].
2) L'occludine est une protéine de jonctions serrées fortement présente dans la BHE. Elle est composée de 4 domaines transmembranaires et leur interaction se fait par leur domaine extracellulaire. C'est la deuxième protéine de jonction serrée majeure de la BHE, mais son rôle est lié à l'assemblage et l'organisation des échafaudages de jonctions serrées. En effet, il a été démontré que son absence n'est pas fatale contrairement aux claudines chez le modèle murin[60,61,72].
3) Les protéines JAM appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et ont un seul domaine transmembranaire. Au sein de la BHE, seulement JAM-1 et JAM-3 semblent être impliquées dans la mise en place des jonctions serrées par leurs interactions extracellulaires homotypiques.
4) La protéine de jonction serrée tricelluline joue principalement un rôle dans la mise en place de jonctions serrées au sein des interactions tricellulaires[14,62,73].

Les protéines de jonctions d'adhérence vont également participer à la formation de la BHE[54]. Les cadhérines sont les composants principaux des jonctions inter-cellulaires au sein de la BHE : elles vont permettre de joindre indirectement les réseaux d'actine des différentes cellules adjacentes via leurs interactions extracellulaires homotypiques et ainsi permettre la formation de jonctions d'adhérence entre les cellules. Ces dernières ne sont pas directement impliquées dans la perméabilité de la BHE, mais vont supporter les jonctions intercellulaires et conduire à la formation de l'endothélium. D'autres protéines d'adhérence, telles que PECAM1, vont également être impliquées dans la formation des jonctions d'adhérence au sein de la BHE[62,74]. Les complexes de jonctions formés par les protéines de jonctions serrées et d'adhérence sont associées à des protéines accessoires cytoplasmiques (Zonula Occludens (ZO), cinguline, caténines, *etc*.). Ces dernières permettent la liaison de ces complexes protéiques au cytosquelette d'actine des cellules endothéliales. C'est cette liaison qui permet de finaliser l'intégrité fonctionnelle et structurale de l'endothélium et sa fonction barrière (perméabilité, régulation sélective). Les protéines accessoires cytoplasmiques sont également essentielles dans la formation des jonctions serrées en régulant la formation et l'organisation des échafaudages de protéines de jonctions serrées à la membrane[14]. Notamment, les protéines ZO (ZO-1, ZO-2, ZO-3) jouent un rôle crucial dans la fonction barrière de la BHE en assurant l'intégrité fonctionnelle et organisationnelle des protéines de jonctions serrées[75].

Liée à cette perméabilité sélective, la polarisation des cellules endothéliales joue un rôle essentiel dans le transport des solutés du sang vers le parenchyme cérébral. En effet, la composition lipidique et glycoprotéique du pôle apical diffère de celle du pôle basal, ce qui va réguler de façon polarisée la réponse à un stimulus ainsi que la sécrétion et le transport des solutés[68]. Contrairement aux vaisseaux sanguins périphériques, le transport sélectif à travers la BHE est assuré principalement par transcytose sélective, un transport cellulaire actif médié par des récepteurs et transporteurs spécifiques à certaines molécules (Figure 8)[61]. Le transport des molécules à travers la BHE est également défini par la taille et la composition chimique[49,61,73].

Plusieurs mécanismes non-spécifiques de transcytose sont mis en place à travers la BHE : la transcytose passive à travers la membrane et le cytosol des cellules endothéliales (ions, gazs, petites molécules lipophiles <400Da), la paracytose passive à travers les jonctions intercellulaires de certaines molécules (O_2, CO_2), la transcytose à l'aide de cellules périphériques ayant la capacité de transmigrer à travers cette dernière, et pour finir la transcytose par adsorption suite à l'interaction entre la membrane cellulaire et le soluté (interactions électrostatiques par exemple)[61,73]. Le passage de tous les autres composés (glucose, acides aminés, nutriments) est médié par des transporteurs cellulaires spécifiques permettant le passage d'un pôle vers l'autre par les voies de sécrétion cellulaire : transporteurs spécifique actifs à efflux de type ABC, ou pompes à efflux (P-gp, BCRP, OATP, MARP1-5), transporteurs spécifiques (GLUT-1, Monocarboxylic acid transporters, L-type amino acids transporters 1) ou récepteurs de transcytose [54,61,66].

Ainsi, la BHE est une barrière cellulaire essentielle pour le maintien de l'homéostasie du SNC. La déstabilisation de la fonction barrière de la BHE, telle qu'une altération de l'expression des protéines de jonctions serrées ou une atteinte des cellules endothéliales, est associée au déclenchement de maladies neurodégénératives, d'atteintes neurovasculaires et à une majoration de la neuroinflammation[54,60,61,72].

VI. L'unité neurovasculaire, une organisation multicellulaire soutenant la BHE

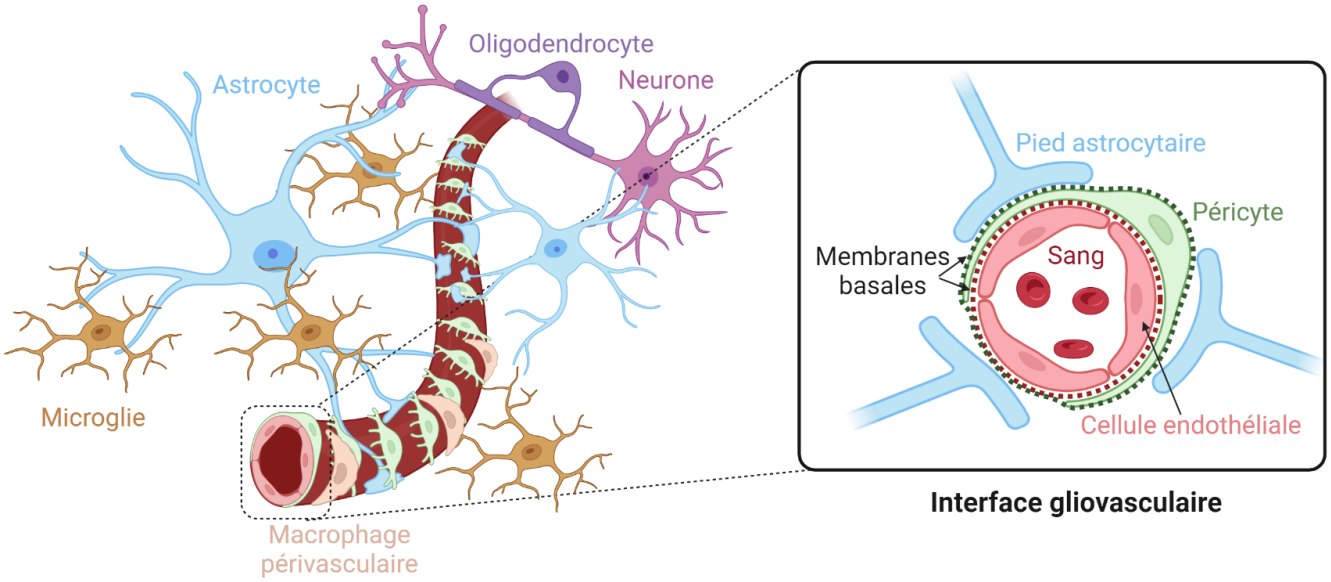


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire au sein de l'unité neurovasculaire ou NVU (Neurovascular Unit)

Les caractéristiques spécifiques des cellules endothéliales de la neurovascularisation permettent la formation de la BHE, mais d'autres types cellulaires du SNC sont nécessaires à la mise en place, le soutien et la régulation de cette fonction barrière. L'ensemble de ces cellules forment un réseau d'interactions cellulaires dynamique et complexe appelé unité neurovasculaire ou NVU (Neurovascular unit) (Figure 9)[60,63,66,76,77]. Les cellules qui composent la NVU sont les cellules endothéliales de la BHE, les péricytes, les astrocytes, les microglies, les macrophages résidents du SNC et les neurones[54,59–61,66,78]. L'ensemble de ces cellules vont interagir directement, ou indirectement par la sécrétion de facteurs solubles, sur les

caractéristiques de la BHE[54,66]. Deux autres acteurs non-cellulaires de la NVU sont les membranes basales soutenant la formation de l'endothélium vasculaire, dont la composition et les caractéristiques peuvent également réguler la BHE[54,66]. Ces différents composants vont réguler différentes fonctions afin de maintenir l'homéostasie du SNC : régulation de la pression sanguine, régulation de la réponse immunitaire, régulation des échanges sang/SNC[59]. Chaque acteur de la NVU va avoir des rôles spécifiques sur la régulation de l'activité de la BHE[59,79].

Différentes cellules murales vont soutenir les vaisseaux sanguins du SNC, et participer à la NVU. Les cellules de muscle lisse vasculaire sont les cellules murales qui vont supporter les artères du SNC, mais elles ne seront pas développées dans ce manuscrit[59,66]. Les péricytes du SNC sont également des cellules murales qui vont envelopper les cellules endothéliales dans la microvascularisation du SNC (capillaires sanguins). Ce sont les cellules périvasculaires majoritaires de la neurovascularisation et elles jouent un rôle majeur dans la formation, le soutien et la régulation de la BHE[61,66,80,81]. En effet, par interaction avec les cellules endothéliales, les péricytes participent activement à la formation et l'organisation des jonctions serrées au sein de la BHE, au soutien métabolique des cellules endothéliales, ainsi qu'à l'expression des transporteurs et récepteurs spécifiques de la BHE[54,61,62,78]. Ils sont donc nécessaires à l'acquisition des caractéristiques spécifiques de la BHE par l'endothélium neurovasculaire[60,66,67]. Les péricytes sont des cellules migrantes recrutées par les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse, mais leur motilité est ensuite limitée. Ils arborent alors uniquement une capacité de contraction, capacité essentielle permettant la régulation de la taille des vaisseaux sanguins et donc de la pression sanguine[59,62,67]. Finalement, ce sont des cellules très peu caractérisées, et d'autres rôles tels que la phagocytose des métabolites neurotoxiques, l'induction de la résistance à l'apoptose des cellules endothéliales et la régulation de la réponse immunitaire (transmigration, signaux immunitaires, *etc.*) ont été proposés mais restent à explorer[54,59,82,83].

Les astrocytes sont l'un des types cellulaires majoritaires de la NVU avec les péricytes[61,66]. Les astrocytes neurovasculaires interagissent avec la BHE et sa membrane basale à l'aide de prolongements cellulaires spécifiques appelés pieds astrocytaires[62]. A l'aide de ses pieds astrocytaires, ces derniers vont pouvoir encapsuler les vaisseaux sanguins et les cellules murales qui les entourent, formant ainsi une interface qualifiée d'interface gliovasculaire[59,67]. A l'aide de ces pieds astrocytaires, les astrocytes participent activement à la régulation de l'imperméabilité de la BHE, apportent un support mécanique et métabolique aux cellules de l'interface gliovasculaire, régulent le transport endothélial, la réponse immunitaire et également la pression sanguine. Par exemple, les astrocytes régulent la contraction des vaisseaux sanguins en modulant le niveau de contraction des cellules murales par la sécrétion de divers facteurs tels que la prostaglandine ou le NO[42,54,59,61,66]. Il est maintenant bien défini que les astrocytes ne sont pas nécessaires à la formation de la BHE, mais leur rôle dans la régulation et le maintien de la perméabilité sélective de celle-ci est primordiale, notamment par la communication intercellulaire avec les péricytes et les cellules endothéliales via l'interface gliovasculaire, que ce soit par leurs interactions directes ou par la sécrétion de facteurs solubles (Wnts, Norrin, angiopotin-1)[54,59,60,62,66,67,84–86]. Au sein de la NVU, les astrocytes participent également au maintien de l'homéostasie de l'espace périvasculaire, via la présence d'aquaporine 4 à la surface des pieds astrocytaires, en facilitant les échanges périvasculaires entre le LCR et le

SNC[59,62,66,67]. De plus, les astrocytes jouent un rôle d'intermédiaires entre le compartiment gliovasculaire et l'ensemble des cellules du SNC et de la NVU[54]. Par exemple, les astrocytes permettent de faire le lien entre les neurones et la circulation sanguine, adaptant ainsi la pression sanguine et l'apport nutritif/métaboliques à l'activité neuronale[23,42,66]. Ainsi, par cette interaction entre les neurones et les astrocytes, il est alors considéré que les neurones font également partie de la NVU[61,62,67]. De plus, il a été démontré que les neurones peuvent également sécréter directement des molécules vasoactives, modulant alors la BHE et la pression sanguine[59].

Deux types cellulaires participent à la réponse immunitaire au sein de la NVU : les microglies, cellules gliales présentes dans l'ensemble du SNC et les macrophages périvasculaires, présents à la périphérie de la neurovascularisation artérielle[39,66]. Ces derniers sont issus de la lignée monocytaire périphérique et ont la capacité de de traverser naturellement la BHE. Ils ne sont pas présents sur l'ensemble de l'arbre vasculaire du SNC, mais uniquement dans un espace spécifique appelé espace de Virchow-Robin. Ils participent activement à la défense immunitaire périvasculaire et à l'élimination des débris cellulaires par phagocytose[66]. Les macrophages périvasculaires semblent également avoir des activités neuroprotectrices en participant au maintien de l'intégrité de la BHE, de sa perméabilité sélective ainsi qu'à la protection de l'espace périvasculaire[62,87]. Cependant, au sein de la NVU, le rôle d'immunomodulation et de régulation de la BHE semblent davantage médiés par les microglies[62,88]. En effet, les microglies sont hautement sensibles aux modifications homéostasiques du milieu périvasculaire et sont donc impliquées dans la surveillance et la protection immunitaire de cet espace[39,59]. Ainsi, lors de la réponse immunitaire, celles-ci participent à la régulation de l'imperméabilité de la BHE, notamment par interaction avec les astrocytes ou les cellules endothéliales, ou par la sécrétion de facteurs solubles tels que des cytokines proinflammatoires[62]. Les microglies sont en interactions avec les différents types cellulaires de la NVU (péricytes, cellules endothéliales, neurones, astrocytes), ce qui va influencer leurs différentes fonctions dans le soutien de la BHE[39,61,62,87–89].

Pour finir, les deux membranes basales ou matrices extracellulaires participant à la formation de la BHE jouent également un rôle dans la régulation de cette dernière, faisant de ces deux membranes des composants non-cellulaires importants de la NVU[90]. Une première membrane basale vasculaire, sécrétée par les cellules endothéliales, soutient et stabilise l'endothélium vasculaire. Une seconde membrane basale parenchymateuse, sécrétée par les péricytes et les pieds astrocytaires, soutient l'adhésion des péricytes sur le pôle basal de BHE et ancre les pieds astrocytaires[59,61,62,67,91,92]. Ces membranes basales sont principalement composées de collagène de type IV, de laminines, de nidogène et de protéoglycanes (Perlecan, Agrine)[62,67]. En plus de leur rôle de soutien et de stabilisation des vaisseaux sanguins, elles jouent également un rôle dans la transduction des signaux à travers la BHE et majore la fonction barrière en participant à la formation des jonctions serrées[62]. Ensemble, les cellules endothéliales, les astrocytes et les péricytes vont moduler la composition de ces membranes basales afin de réguler la perméabilité sélective de la BHE. A l'inverse, la composition de la membrane basale va également modifier l'interaction de la BHE avec les cellules de la NVU en modulant le recrutement des astrocytes et des péricytes[59].

La NVU met en avant la diversité, la complexité et la complémentarité des rôles des différents types cellulaires formant le SNC. De plus, étant donné leurs rôles sur la régulation et le maintien de la BHE, l'atteinte de ces cellules va alors exacerber les atteintes neurologiques en altérant la fonction barrière de la BHE et donc l'homéostasie du SNC[59,62,80,93].

Chapitre 2 : Infections virales du système nerveux central

L'organisation du SNC et les fonctions associées à ses différentes cellules ayant été décrites dans le précédent chapitre, les mécanismes d'infection virale du SNC et ses conséquences seront présentés dans ce chapitre 2.

I. Généralités sur la neurovirologie et les émergences virales récentes

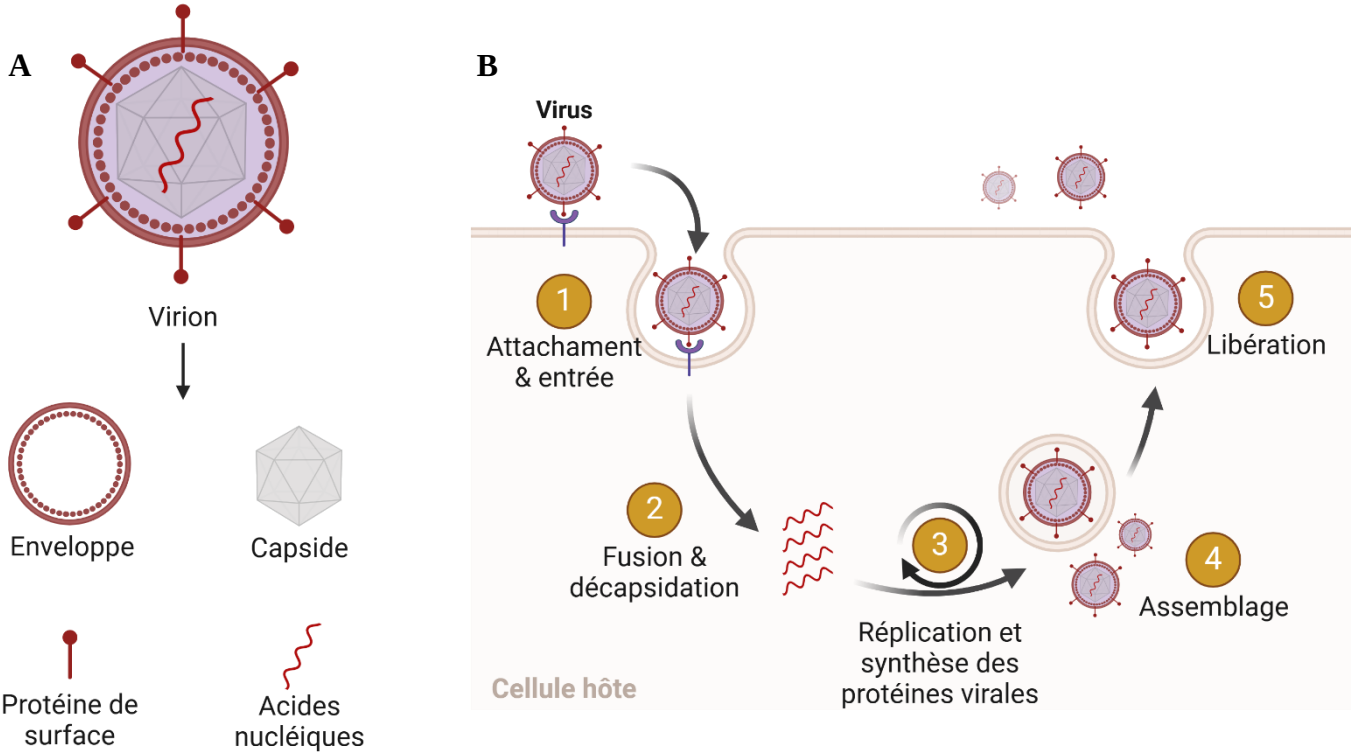


Figure 10 : Représentation schématique d'une particule virale et du cycle de réplication viral. A/ Représentation schématique simplifiée de la morphologie d'une particule virale ou virion. **B/** Cycle de réplication simplifié d'une partie virale au sein d'une cellule hôte, de l'entrée (1) à la libération de nouvelles particules virales (5).

Tout d'abord, il est important de définir certains termes et notions de virologie. Très brièvement, les virus sont des micro-organismes parasites intra-cellulaires obligatoires. Ils forment une particule infectieuse, appelé virion, et composé d'un ou plusieurs brins d'acides nucléiques (ARN ou ADN) protégée par une coque protéique appelé capside, elle-même parfois entourée d'une bicouche lipide appelée enveloppe (Figure 10A)[1]. Les virus sont extrêmement diversifiés en termes de structure, de morphologie, de phylogénie et d'hôtes[1]. Les virus vont infecter un hôte et se disséminer dans son organisme : on parle de cycle de multiplication. Une fois en contact avec ses cellules cibles, le virus va les infecter pour se répliquer : on parle alors de cycle de réplication. Ce cycle est composé de différentes étapes permettant aux virus d'entrer dans la cellule, de libérer son matériel génétique, de se répliquer, d'assembler de nouvelles

particules virales puis de les libérer hors de la cellule (Figure 10B). Ce cycle de réplication qui varie en fonction du virus fait intervenir deux principes : la susceptibilité cellulaire, correspondant aux cellules que le virus peut infecter par interaction spécifique entre ses protéines de surface (capside et/ou enveloppe) et les récepteurs cellulaires, et la permissivité cellulaire, qui est la capacité d'un virus à se multiplier en détournant la machinerie de la cellule infectée[1]. Ces deux principes définissent le tropisme cellulaire d'un virus, c'est-à-dire le ou les types cellulaires qui vont permettre la réalisation de l'ensemble de son cycle de réplication. Certains virus, lors du cycle de réplication, vont induire la mort ou l'altération fonctionnelle des cellules infectées induisant alors à une pathologie chez l'hôte : ces mécanismes sont appelés mécanisme de pathogénèse[1].

La neurovirologie est une branche de la virologie dont les virus d'intérêt sont des virus neurotropes ou neuroinvasifs. Le neurotropisme est défini par la capacité d'un virus à effectuer son cycle de réplication dans des cellules neurales (neurones, cellules gliales)[94]. De plus, les virus ayant la capacité d'accéder au système nerveux en dépit de ses différentes barrières sont qualifiés de neuroinvasifs[1,95,96]. En effet, le SNC correspond à un site de réplication et/ou à un réservoir viral de choix pour les virus lors des infections chroniques ou persistantes/latentes comme lors de l'infection par le HSV-1. Dû à son importante demande en ressources énergétiques, le SNC est une source majeure de métabolites isolée du reste de l'organisme, ce qui favorise la réplication et la persistance virale[37,95,97]. La capacité d'un virus à induire une pathologie est défini par sa neurovirulence et ses mécanismes de neuropathogénèse[1].

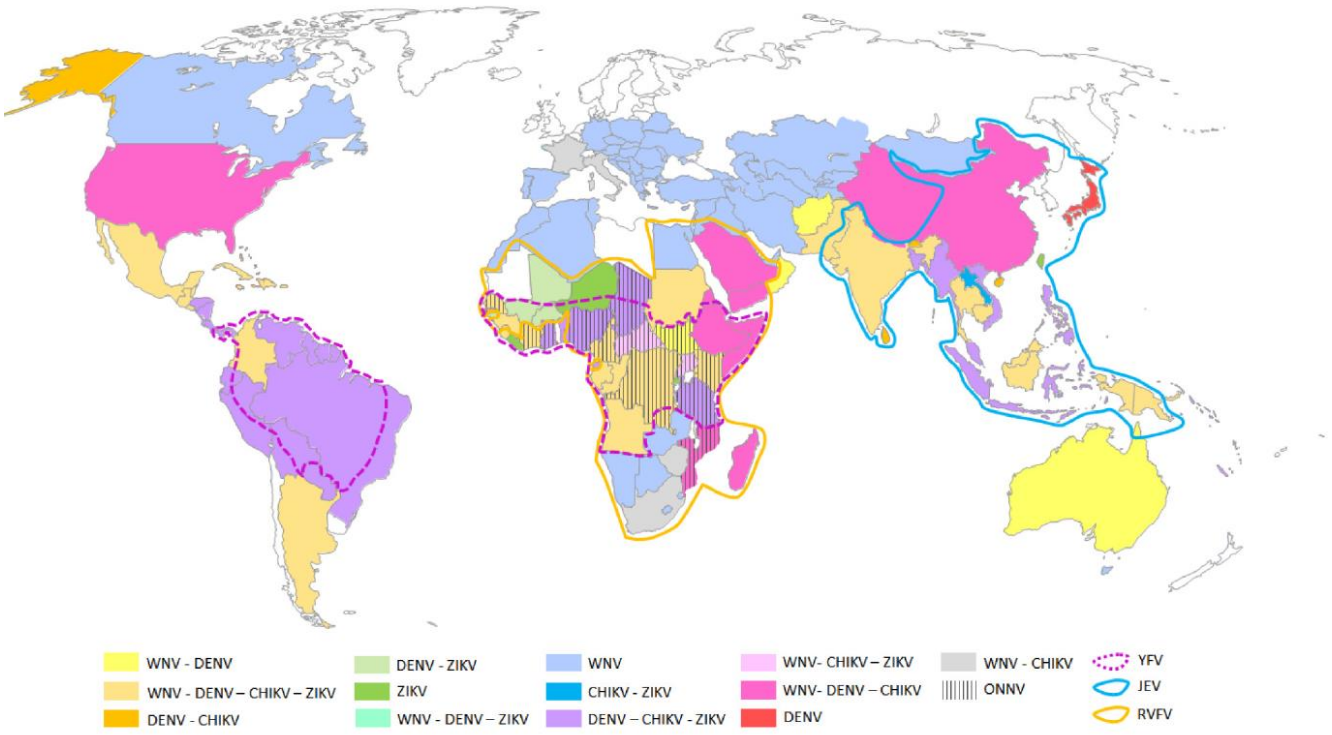


Figure 11 : Distribution géographique de différents arbovirus à l'échelle du globe (2021) (Viglietta et al., 2021)

Les pathologies d'origines virales représentent un risque de santé publique et socio-économique important[98–101]. Or, les 5 dernières décennies, une augmentation de l'émergence virale a été notée[95]. L'émergence ou la réémergence peut être définie par l'apparition nouvelle

ou la réapparition sur un territoire donné à un temps donné d'un pathogène, pouvant alors être responsable d'une augmentation rapide du nombre de nouveaux cas (épidémie) parfois jusqu'à l'échelle mondiale (pandémie)[1,5,102]. Durant les dernières décennies, il a été noté une augmentation de l'émergence de maladies neurologiques d'origine virale, et notamment dues à des virus à ARN[5,95,103,104]. Ces pathologies neurologiques d'origine virale se manifestent principalement par une encéphalite, c'est-à-dire une inflammation de l'encéphale[5]. Plus spécifiquement, les arbovirus (Arthropod-Bornes Viruses) sont représentés par de nombreux virus neurotropes capables d'induire des neuropathologies et sont responsables des (ré-)émergences les plus observées de ces dernières décennies (Figure 11)[5,105–111]. Ce sont principalement des virus à ARN transmis par des vecteurs arthropodes hématophages (moustiques, tiques, *etc.*) entre humains ou principalement entre animaux et humains (zoonoses). Ils représentent un groupe polyphylétique de 9 familles virales[99]. Différents facteurs écologiques et anthropiques sont responsables de l'augmentation de ces émergences virales[2,102]. La mondialisation, le développement démographique mondial et l'urbanisation massive ont engendré une exposition accrue des populations humaines aux pathologies virales ainsi que leurs extensions géographiques[2,109,112]. De plus, les modifications climatiques et environnementales récentes sont responsables d'une augmentation des zones de contact faune sauvage-faune domestique ainsi que d'une modification de l'écologie des hôtes et des vecteurs, engendrant alors une augmentation de l'émergence de pathologies d'origine zoonotique[2,3,5,95,109,113,114]. De plus, les virus à ARN sont décrits comme ayant un taux de mutation plus important, favorisant leur émergence par saut d'espèces ainsi que la modification du tropisme cellulaire[1,102,115,116]. En santé humaine, la plupart des arbovirus sont réunis en 3 grands groupes : les virus de la classe des *Bunyaviricetes* (TOSV, CCHFV, RVFV, *etc.*), la famille des *Flaviviridae* (USUV, WNV, ZIKV, YFV, DENV, *etc.*), et la famille des *Togaviridae* (CHIKV, *etc.*)[105].

Les émergences virales sont devenues préoccupantes pour la santé publique à l'échelle du globe[117]. Ainsi, les autorités de santé publique ont défini différentes listes orientant les mesures sanitaires, de prévention, de sécurité biologique et de recherche scientifique sur ces pathologies émergentes ou à fort potentiel d'émergence[118,119]. On trouvera par exemple la liste des agents de bioterrorisme potentiel du CDC (United States Centers for Diseases Control and Prevention) ou la liste de recherche prioritaire de l'organisation mondiale de la santé (OMS)[120]. Il est nécessaire de mieux maitriser les mécanismes d'émergence virale et de neurovirulence afin de prendre en charge efficacement les pathologies virales qui sévissent actuellement, ainsi que de prévenir nouvelles émergences virales et leurs impacts sanitaires et socio-économiques[2,95,105,121].

II. Les manifestations neurologiques dues à l'infection par un virus neurotrope

Il existe de nombreux virus neurovirulents issus de différentes familles virales avec des mécanismes de neuroinfection divers et induisant des manifestations cliniques variées[122–124]. Les virus neurotropes vont pouvoir infecter le SNC et/ou le SNP, conduisant à des manifestations cliniques souvent sévères et associées à un taux de mortalité élevé[123]. De plus, en fonction du type d'infection du virus (aiguë, chronique ou persistante/latente), la pathologie neurologique associée sera aiguë ou chronique et pourra être responsable de séquelles

neurologiques parfois définitives[1,108,109,123,125]. Le développement d'une pathologie neurologique est lié à une atteinte de l'activité des cellules neurales (dégénérescence, mort cellulaire) conduisant à une perte ou une diminution de l'activité neurologique[126]. Cette atteinte peut être causée directement par l'activité lytique du virus, ou indirectement par la réponse immunitaire de l'hôte au sein du SNC[5,125,127]. Ainsi, de nombreux virus neurotropes vont pouvoir accéder au SNC (neuroinvasif), potentiellement infecter des cellules neurales (neurotrope), puis induire une pathologie neurologique (neurovirulent)[95,103,120,122,123,128–130] :

Tableau 1 : Exemples de virus neurotropes capables d'induire une pathologie humaine d'ordre neurologique

Taxons (Famille)	Exemples
Arenaviridae	LCMV
Coronaviridae	MERS-CoV, SARS-CoV-2
Filoviridae	EBOV, MARV
Flaviviridae	WNV, ZIKV, USUV, JEV, DENV
Nairoviridae	CCHFV
Orthoherpesviridae	HSV, EBV, VZV, CMV
Orthomyxoviridae	IAV
Paramyxoviridae	NiV, HeV, MV, MuV
Phenuiviridae	RVFV
Picornaviridae	Poliovirus, EV71
Rhabdoviridae	RABV
Togaviridae	CHIKV, MAYV

Ce tableau a pour but d'illustrer de façon non-exhaustive la diversité phylogénétique des virus capables d'induire une pathologie neurologique. Etant donné la diversité de fonctions associées au SNC, les manifestations cliniques issues d'une atteinte neurologique peuvent être très diverses en fonction de la localisation de cette atteinte dans le SNC. Cependant, le déclenchement de symptômes neurologiques est principalement lié à une atteinte du tissu nerveux, une neuroinflammation et des hémorragies cérébrales. Différents compartiments du SNC peuvent être atteints: l'arbre neurovasculaire (vascularite), l'encéphale (encéphalite), les méninges (méningite), la moelle épinière (myélite) ou encore les nerfs (névrite)[5,96,103,109,120,131]. Un tableau clinique commun à la plupart des infections du système nerveux est la présence d'une hyperthermie importante associée à des céphalées. Cependant, en fonction du compartiment du système nerveux atteint, le tableau clinique et les symptômes neurologiques peuvent être très divers[5,109,120,132] :

1) Troubles sensitifs : perte de sensation (toucher, odorat, *etc.*), diminution ou perte de la vue, douleurs musculaires, *etc.*
2) Troubles moteurs : paralysie, myopathie, *etc.*
3) Troubles de la conscience : confusion, hallucination, vertiges, convulsions, coma
4) Atteintes organiques diverses : défaillance cardio-respiratoire, défaillance rénale, *etc.*

Le spectre des symptômes associés aux pathologies neurologiques est très large, dû à la diversité de fonctions du système nerveux, mais est aussi dépendant de facteurs viraux (souche virale, virus, neurotropisme) et de facteurs spécifiques de l'hôte[97,109]. En effet, certains facteurs

à risques de l'hôte peuvent majorer le déclenchement et/ou la sévérité de pathologies neurologiques lors d'infection virales : le système immunitaire de l'hôte (mémoire immunitaire, auto-immunité, immunodépression, polymorphisme génétique populationnel), son âge (fœtus, nouveau-né, personne âgée), sa comorbidité, ainsi que divers facteurs génétiques et environnementaux[103,108,122,125,132,133].

III. Les mécanismes de neuroinvasion virale

Afin d'accéder à ce système biologique isolé qu'est le SNC, plusieurs stratégies d'invasion sont décrites pour les virus neurotropes ou neuroinvasifs en dépit de l'existence de ses différentes barrières[103]. Ces mécanismes sont qualifiés de mécanismes de neuroinvasion et sont divisés en fonction des voies permettant aux virus de rejoindre le SNC : la voie hématogène, c'est-à-dire par le sang, et la voie non-hématogène[96,110]. Ces mécanismes sont ici décrits pour les virus, mais ils sont également partagés et caractérisés pour d'autres micro-organismes pathogènes tels que les bactéries ou les parasites neuroinvasifs (*Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *etc.*)[103,134,135]. On distinguera alors plusieurs mécanismes de neuroinvasion en fonction de la voie de dissémination jusqu'au SNC[96,136,137] (Figure 12) :

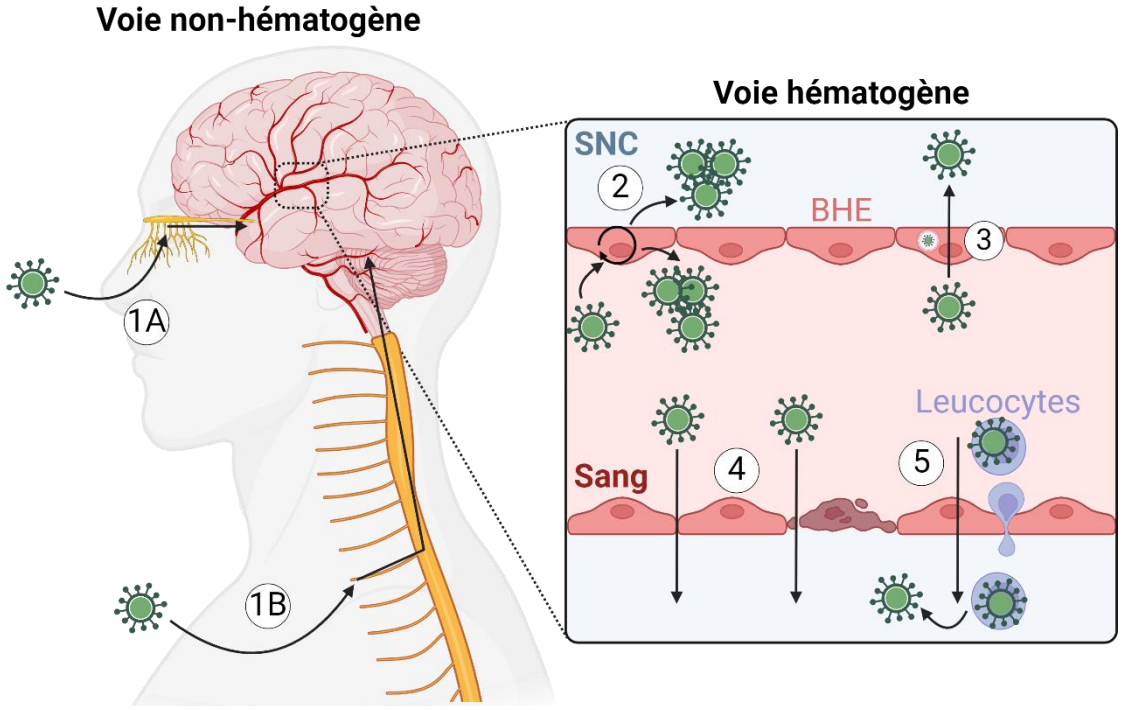


Figure 12 : Stratégie de neuroinvasion des virus invasifs pour accéder au système nerveux central à partir du système périphérique : 1/ Transport axonal vers le corps cellulaire des neurones à partir des axones des nerfs olfactifs (A) ou à partir des nerfs du système nerveux périphérique général (B), 2/ Infection directe des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE), 3/ Transcytose à travers les cellules endothéliales de la BHE, 4/ Paracytose entre les cellules endothéliales, passive ou suite à une déstabilisation de l'intégrité de la BHE, 5/ Mécanisme de cheval de Troie par infection de cellules capables de transmigrer à travers la BHE comme les leucocytes. (SNC : système nerveux central)

1) La voie non-hématogène : mécanisme de transport axonal à partir des nerfs olfactifs ou périphériques
2) La voie hématogène : mécanisme de cheval de Troie, mécanisme d'infection directe et mécanisme de diffusion transcellulaire.

Tout d'abord, certains virus sont capables d'accéder au SNC par un mécanisme qualifié de transport axonal (Figure 12, 1A/B)[96,138]. Ce mécanisme correspond à l'accès au SNC suite à l'infection au niveau des synapses des terminaisons axonales des nerfs olfactifs ou d'autres nerfs périphériques, puis par le transport des virus jusqu'au corps cellulaires des neurones se trouvant au sein du SNC[138,139]. Ce mécanisme de transport axonal est partagé par de nombreux virus neuroinvasifs tels que WNV, JEV, TBEV, HSV ou encore RABV[96,110]. En effet, ces virus ont développé la capacité de détourner les mécanismes de transport intracellulaire afin d'être acheminés de la périphérie de l'axone vers le corps cellulaire des neurones[134,138]. De plus, on qualifiera plus précisément ce mécanisme en fonction du sens de ce transport : soit rétrograde, c'est-à-dire de l'axone vers le corps cellulaire uniquement (RABV), soit antérograde, c'est-à-dire capable du corps cellulaire vers l'axone (HSV-1)[134]. Ce mécanisme permet aux virus d'accéder au SNC par une voie non-hématogène sans avoir à passer les différentes barrières cellulaires isolant le SNC du reste de l'organisme et en évitant le système immunitaire de l'hôte présent dans le sang[96].

D'autres virus utilisent la dissémination dans l'organisme par le compartiment sanguin qui irrigue l'ensemble de l'organisme, dont le SNC, et cette voie est qualifiée de voie hématogène. Trois différents mécanismes de neuroinvasion à partir de la voie hématogène ont été caractérisés : l'infection directe des barrières cellulaires, la diffusion transcellulaire (paracytose, transcytose) et le mécanisme de cheval de Troie (Figure 12, 2-5). Ainsi, plusieurs virus neuroinvasifs accèdent au SNC par le mécanisme d'infection directe des cellules endothéliales de la BHE[140]. En effet, des virus tels que WNV, USUV, NiV ou ZIKV sont capables d'infecter les cellules endothéliales de la BHE, de se répliquer et d'ensuite libérer les virions néoformés aux deux pôles de la BHE : vers le pôle apical (compartiment sanguin) et le pôle basal (SNC)[134,141–144]. Ce mécanisme présente le double intérêt de permettre au virus de réaliser son cycle de réplication ainsi que de passer outre une des protections du SNC. De plus, tout comme la BHE, d'autres barrières précédemment décrites peuvent participer à la neuroinvasion par la voie hématogène. En effet, il a pu être démontré que cette voie peut conduire à l'infection des cellules épithéliales de la BSR externe par ZIKV par exemple pour accéder à la rétine ou encore par l'infection des cellules épithéliales de la BSLCR, permettant l'accès au LCR à certains virus tels que LCMV, CHIKV ou SARS-CoV-2[96,134,145,146]

Certains virus vont pouvoir diffuser à travers les cellules endothéliales et accéder au pôle basal de la BHE sans notion de réplication, mais en détournant les voies de sécrétion cellulaire à leurs avantages en permettant leur transcytose à travers la BHE[144,147]. On pourrait par exemple citer cette capacité de neuroinvasion pour JEV ou celle plus récemment décrite pour SARS-CoV-2[110,148]. Utilisant également une neuroinvasion transcellulaire à travers les cellules endothéliales de la BHE, il a aussi été démontré que certains virus tels que WNV sont capables d'une diffusion paracellulaire passive par déstabilisation des jonctions serrées de l'endothélium[134,149]. Ce mécanisme de paracytose des virions du compartiment sanguin vers le SNC à travers la BHE est associé à une rupture de l'intégrité de cette dernière. En effet, certains composants viraux, l'infection directe de la NVU ou la mise en place d'une réponse immunitaire (systémique, SNC) peuvent conduire à une atteinte de la fonction barrière de la BHE. Cette altération permet donc une diffusion passive et paracellulaire des virions présents dans le compartiment sanguin vers le SNC[110,134,140,142,144,150–153]. Dans plusieurs infections

causées par des flavivirus, la déstabilisation de l'intégrité de la BHE serait d'ailleurs un facteur clé dans la neuroinvasion qui suit l'infection systémique, que ce soit par l'infection directe des cellules endothéliales ou par la mise en place d'une réponse inflammatoire systémique[144].

Enfin, le dernier mécanisme associé à l'accès au SNC par la voie hématogène est le mécanisme de cheval de Troie. Ce mécanisme est lié principalement aux leucocytes ayant une capacité de migration et de phagocytose dans la clairance microbienne tels que les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques, les cellules NK, les lymphocytes ou encore les neutrophiles[96,134]. En effet, certains virus ont développé une capacité de résistance à la phagocytose ou la capacité d'infecter ces cellules immunitaires, tels que WNV, JEV, ZIKV, JCV, EV71 ou le HIV[129,134,142,143]. Ces virus vont alors utiliser la capacité naturelle de ces cellules à transmigrer à travers la BHE, c'est-à-dire à traverser la BHE suite à leurs interactions et la modulation des jonctions serrées. Tout comme l'accès au SNC par la voie non-hématogène, ce mécanisme a le double avantage de pouvoir passer les différentes barrières cellulaires du SNC tout en évitant le système immunitaire. En effet, ce mécanisme est également décrit pour la neuroinvasion des coxsackievirus à travers la BSLCR suite à l'infection de cellules myéloïdes tels que les leucocytes[96,134]. Cependant, en conditions physiologiques normales, la BHE régule très finement la leucopédèse des cellules immunitaires et leur accès au SNC[144]. C'est l'environnement périphérique inflammatoire et/ou l'infection directe des cellules immunitaires qui peut conduire à la majoration de l'expression de protéines d'adhérence la BHE et/ou les cellules immunitaires infectées et donc leur capacité de transmigration[142,147].

Ainsi, malgré la présence de barrières cellulaires hautement sélectives, les pathogènes en générale, dont les virus, ont développé plusieurs mécanismes leur permettant d'accéder au SNC afin de poursuivre leur cycle de multiplication. Un même pathogène peut avoir un ou plusieurs mécanismes de neuroinvasion, comme c'est le cas de WNV qui utilise le transport axonal, l'infection directe, le cheval de Troie et la diffusion paracellulaire[134,149].

IV. La réponse immunitaire du SNC

1. *Généralités sur le système immunitaire*

Afin de lutter contre les maladies infectieuses, qu'elles soient d'origine bactérienne, virale ou fongique, il est important de comprendre certains aspects généraux du système immunitaire et les stratégies de résistance connues face aux infections microbiennes. Tout d'abord, plusieurs barrières physiques (la peau, les *epithelia* formant les muqueuses) ou chimiques (peptides anti-microbiens) isolent et protègent le compartiment intérieur de l'extérieur et inhibe l'entrée de micro-organismes pathogènes[1,154,155]. Ces barrières physiques sont également associées à des communautés microbiennes commensales telles que le microbiote intestinal et le microbiote cutanée. Or, ces microbiotes forment également une barrière microbiologique protectrice en inhibant la colonisation de ces barrières par des micro-organismes pathogènes tout en participant à la maturation du système immunitaire[155,156].

Le système immunitaire est le système biologique complexe qui va orchestrer les défenses intérieures contre les micro-organismes et les autres éléments extérieurs

potentiellement pathogènes. Ce système immunitaire est formé de 3 niveaux de tissus lymphoïdes[154,157,158] :

1) Les tissus ou organes lymphoïdes primaires : ce sont les tissus et organes responsables de la production et de la maturation des cellules composant le système immunitaire (moelle osseuse, thymus)
2) Les tissus ou organes lymphoïdes secondaires : ce sont les organes et tissus de circulation, d'accumulation et de rencontre des cellules immunitaire (rate, ganglion lymphatique)
3) Le tissu lymphoïde tertiaire : il correspond à la lymphe et au système lymphatique. C'est un système vasculaire unidirectionnel associé aux organes lymphoïdes et qui irrigue l'ensemble des tissus de l'organisme. Il a un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie générale et notamment par son activité de filtration du liquide interstitiel tissulaire en l'acheminant vers les tissus et organes lymphoïdes secondaires

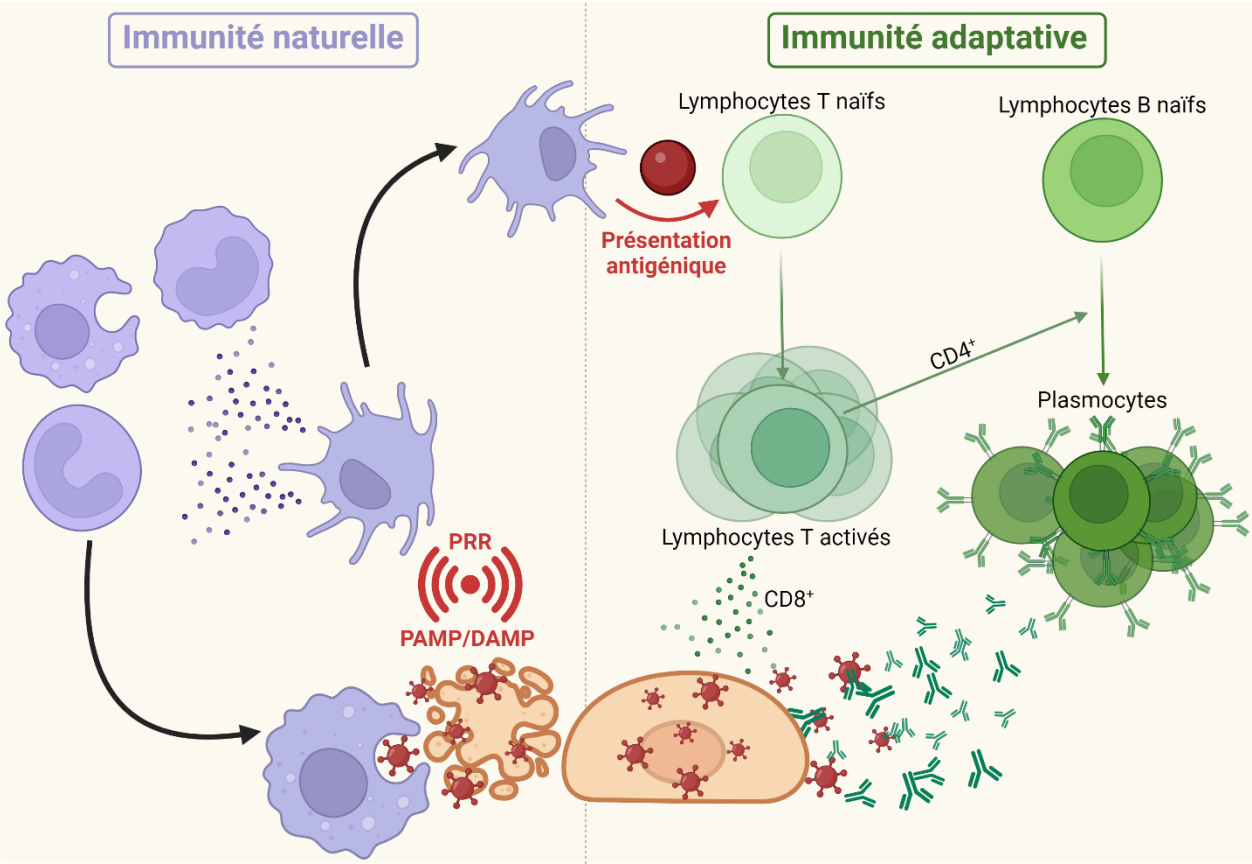


Figure 13 : Représentation schématique et simplifiée de la réponse immunitaire. La reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP : Pathogens Associated Molecular Pattern) ou aux dégâts tissulaires (DAMP : Damage Associated Molecular Pattern) par des récepteurs des cellules immunitaires (PRR, Pathogens Recognition Receptor) conduit à la mise en place de la réponse immunitaire naturelle (chimiotactisme des autres cellules immunitaires, phagocytose). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) vont ensuite permettre l'activation et la maturation de la réponse immunitaire adaptative par la présentation antigénique. Cela va conduire à la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T auxiliaires ($CD4^+$) ou cytotoxiques ($CD8^+$) ainsi qu'à la production de plasmocytes producteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène présenté.

En cas d'activation suite à la rencontre d'un agent pathogène ou d'autres molécules immunogènes, le système immunitaire va induire la mise en place d'une réponse immunitaire. La molécule ou un élément du pathogène étant reconnu par le système immunitaire et ayant induit cette activation est qualifié d'antigène[1,159]. Il existe ainsi deux types de réponses

immunitaires : une réponse précoce (premières heures) qualifiée de réponse innée ou naturelle et la réponse tardive (plusieurs jours) appelée réponse acquise ou adaptative (Figure 13)[1,154]. En fonction du type de réponse, différentes cellules et acteurs immunitaires sont activés : des effecteurs qui auront pour but l'application des réponses de lutte contre le pathogène, et des régulateurs qui auront le rôle de mise en place, de la coordination, puis de l'inhibition de la réponse immunitaire lorsque que le pathogène est éliminé, ce que l'on appelle la clairance. Les cellules de la réponse immunitaire, ou leucocytes, sont pour la plupart issues de la lignée hématopoïétique produite par la moelle osseuse, qui se différenciera en lignée myéloïde, conduisant à la production de nombreux leucocytes, ou en lignée lymphoïde, conduisant à la production des NK et des lymphocytes[154]. Au sein du système lymphatique, du compartiment sanguin et des différents tissus de l'organisme, les leucocytes vont être en constante circulation afin de surveiller l'apparition d'un agent pathogène : ce phénomène est qualifié d'immunosurveillance[157].

La réponse naturelle précoce est médiée par les leucocytes et notamment par leur activité de phagocytose : macrophages, cellules dendritiques, cellules NK, neutrophiles, *etc.* Les leucocytes, mais également de nombreux autres types cellulaires, sont stimulés et activés par des motifs conservés et partagés par certains groupes de micro-organismes pathogènes, appelé Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMP), ou par des signaux de dommages cellulaires appelés Damage Associated Molecular Pattern (DAMP). Les cellules sont capables d'être activées par ces PAMP/DAMP grâce à la présence de récepteurs spécifiques à la membrane cellulaire ou intra-cellulaire qui sont appelés Pathogen Recognition Receptor (PRR). Suite à leurs activations, les leucocytes vont mettent place la réponse immunitaire naturelle pour lutter contre l'infection dès ses premières heures. L'activation des cellules de la réponse naturelle va conduire à la destruction du pathogène dans le phagosome intracellulaire ou à la lyse des cellules infectées (activité de phagocytose, activité cytotoxique des cellules NK). D'autres acteurs vont également être impliqués tels que le système du complément, une cascade immunologique composée de protéines circulantes dont l'activation conduit à l'élimination des pathogènes ou des cellules infectées[160]. De plus, des régulateurs immunitaires sous forme de messagers protéiques vont être sécrétés par les leucocytes ou d'autres types cellulaires qui ont été activés par des PAMP : les cytokines et les chimiokines. Ces protéines vont participer à la régulation de la réponse immunitaire, de façon localisée et/ou systémique, et vont conduire à une inflammation et une hyperthermie pour lutter contre l'infection. En effet, les cytokines régulent l'état d'activation des cellules et leur viabilité, et les chimiokines vont induire le recrutement des cellules immunitaires au site d'infection par chimiotactisme[154,161]. De plus, l'activation de la réponse naturelle est nécessaire à la mise en place plus tardive de la réponse adaptative. En effet, une activité cellulaire régulatrice majeure est décrite dans la réponse naturelle : la présentation antigénique. Suite à leurs activations, certains leucocytes vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires et mettre en place une activité de présentation d'antigène aux cellules de l'immunité adaptative, et ils sont alors qualifiés de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Par ce mécanisme ainsi que par la sécrétion de cytokines et chimiokines, les CPA vont permettre l'activation des cellules de la réponse adaptative et vont moduler la prolifération, la différenciation et le recrutement de ces cellules au site de l'infection[1,154,162].

La réponse adaptative tardive, uniquement médiée par les lymphocytes est, une réponse spécifique à un antigène ou micro-organisme et fait appel à la notion de mémoire immunitaire en conservant cette spécificité dans certaines populations de cellules immunitaires afin d'accélérer la mise en place de la réponse adaptative en cas de nouvelle rencontre avec celui-ci[1,154]. Les lymphocytes T $CD4^+$ ou auxiliaires sont les cellules régulatrices de cette réponse qui vont coordonner la réponse adaptative. Celles-ci vont permettre l'activation des lymphocytes B naïfs, c'est-à-dire non activés, et leurs différenciations en plasmocytes. Ces cellules vont permettre la mise en place de la réponse adaptative à médiation humorale en sécrétant des anticorps spécifiques de l'antigène ayant permis l'activation des lymphocytes. Les anticorps sont les effecteurs de la réponse adaptative à médiation humorale, notamment par l'altération de l'infectiosité des pathogènes extra-cellulaires par opsonisation, c'est-à-dire en saturant leur membrane externe par interaction spécifique, ce qui favorise également sa phagocytose et l'activation du système du complément. De même, les lymphocytes T $CD4^+$ auxiliaires vont conduire à l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques, les cellules effectrices de la réponse adaptative à médiation cellulaire grâce à leurs activités cytotoxiques permettant la lyse des cellules infectées ou du pathogène[154,160].

2. *Généralités sur la réponse antivirale*

Tout comme la réponse immunitaire générale, la réponse antivirale est mise en place au cours de la réponse naturelle précoce et de la réponse adaptative tardive[1,154]. La réponse naturelle précoce antivirale est principalement médiée par la mise en place de la réponse interféron (IFN) et par l'activité de lyse des cellules infectées par les cellules NK (Natural Killer) [154,163]. L'activation de la réponse naturelle précoce suit la détection de PAMP spécifiques aux virus par des PRR membranaires ou intracellulaires qui sont spécialisés dans cette reconnaissance[1,164]. Ces PRR sont par exemple les Toll-Like Receptors endosomales (TLR 3/7/8/9) et les PRR cytoplasmiques tels que RIG-1-Like Receptors (RLRs) ou Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptors (NLR) qui sont spécialisés dans la reconnaissance d'acides nucléiques d'origine virale tels que l'ARN double brin ou l'ADN simple brin[1,154]. Cette reconnaissance permet l'activation d'une cascade signalétique cellulaire dont les effecteurs terminaux sont des facteurs de transcription spécifiques appelés Interferon Regulatory Factor (IRF) et qui conduisent à la production de l'IFN, ainsi que d'autres cytokines de la réponse immunitaire telles que des cytokines proinflammatoires (Figure 14A)[1,154,163]. L'IFN est la cytokine majeure de la réponse antivirale et ses actions sont autocrine, paracrine et endocrine. Il existe 3 types d'IFN[1,163] :

1) IFN de type I : ils correspondent à toutes les formes d'IFN capables d'interagir avec les récepteurs membranaires ubiquitaires appelés Interferon-alpha Receptor (IFNAR). On retrouve principalement les IFN-α et IFN-β, mais d'autres formes d'IFN de type I ont pu être décrites (IFN-ε, IFN-κ et IFN-ω). Ce sont les IFN majeurs de la réponse antivirale, notamment par la mise en place des activités cellulaires antivirales et également par différentes activités immunomodulatrices.
2) IFN de type II : il est principalement représenté par l'IFN-γ qui va se lier au récepteur membranaire Interferon-gamma Receptor (IFNGR). Cette réponse interféron est principalement associée à différentes activités immunomodulatrices.

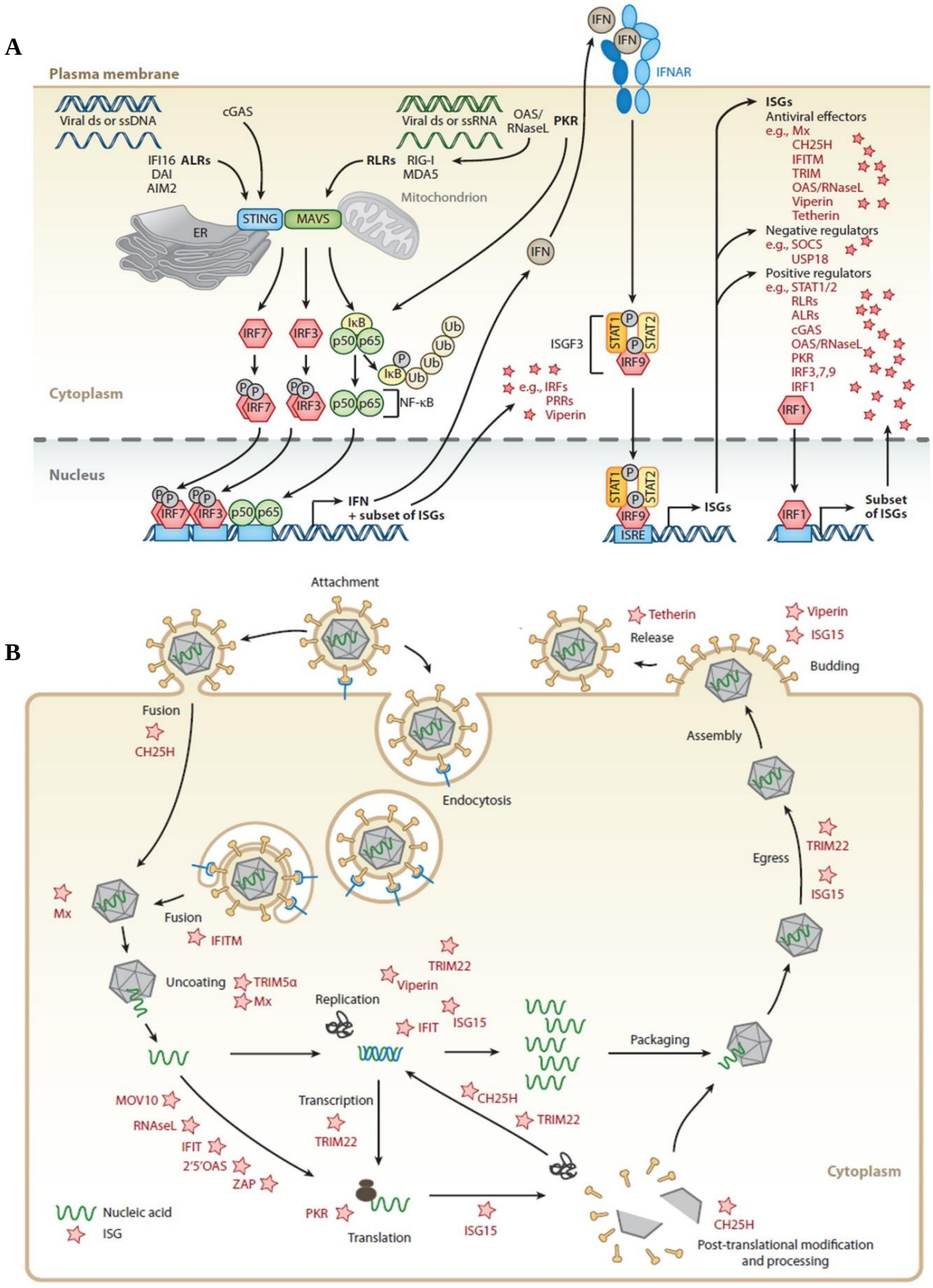


Figure 14 : Représentation schématique de la réponse interféron (IFN). A/ Représentation des récepteurs et cascades signalétiques cellulaires conduisant à la production d'interféron (gauche) puis d'Interferon-Stimulated Genes (ISG, droite). **B/** Représentation schématique et non exhaustive du rôle inhibiteur des ISG (étoiles rouges) sur les différentes étapes du cycle de réplication virale (Schneider et al., 2014)

3) IFN de type III : ils correspondent à toutes les formes d'IFN capables d'interagir avec le récepteur membranaire composé de l'Interleukin 10 Receptor 2 (IL10R2) et de l'Interferon-lambda Receptor 1 (IFNLR1). On en retrouve 3 formes : l'IFN-λ1, IFN-λ2 et IFN-λ3. Les IFN de type III ont des fonctions similaires à celle de l'IFN de type I, mais à une échelle plus localisée : contrairement aux IFNAR qui sont présents de façon ubiquitaire à la surface des cellules, les IFNLR1 seraient spécifiques aux barrières cellulaires, tels que l'épithélium intestinal ou la BHE[168].

Les différents IFN jouent plusieurs rôles dans la réponse antivirale : ils permettent l'activation antivirale des cellules infectées et non-infectées[1,154,163]. Par la mise en place de cet état d'activation, la réponse interféron permet d'améliorer la capacité de détection des virus par les cellules (expression des PRR), permet la mise en place de réponse cellulaire antivirale efficace inhibant l'infection et la réplication du virus, puis après la clairance virale, permet aux cellules de retourner à un état physiologique normal[163]. En effet, l'activation des récepteurs à l'IFN déclenche une voie signalétique spécifique, appelé JAK/STAT, qui permet l'expression d'effecteurs et immunomodulateurs antiviraux : les Interferons-Stimulated Gene (ISG)[161,163,165]. Ces ISG jouent de nombreux rôles à large spectre afin d'inhiber le cycle de réplication du virus dans ces différentes étapes (Figure 14B). De plus, l'activation des PRR ainsi que la production de certains ISG vont conduire à l'activation de facteurs cellulaires intrinsèques permettant également de lutter contre l'infection virale : déclenchement de la mort cellulaire programmée, activation de facteurs de restriction (protéines cellulaires participant à l'inhibition du cycle de réplication), autophagie, *etc.*[1,154]. Par exemple, cette activation permet la mise en place de l'apoptose des cellules, ou mort cellulaire programmée, par le déclenchement d'une cascade signalétique conduisant à l'activation des caspases cellulaires, des enzymes induisant la mort cellulaire[1,166]. L'apoptose permet ainsi de limiter la réplication du virus, et induit également l'expression de phosphatidylsérine à leur surface favorisant la phagocytose des cellules infectées[1,154]. Cette stratégie de mort cellulaire est une composante essentielle de la lutte antivirale[1,154,167]. Tout comme la réponse immunitaire en général, une dérégulation et le polymorphisme génétique de la réponse interféron sont associés à des pathologies auto-immunes ou à une lutte inefficace contre les infections virales[97,163,168].

Pour finir, les fonctions immunomodulatrices de la réponse IFN sont essentielles à la mise en place de la réponse adaptative antivirale. La réponse adaptative va spécialiser cette lutte antivirale envers un antigène viral, qui est principalement une protéine de la capside ou de l'enveloppe virale (protéine de surface)[1]. La réponse adaptative est ici médiée par les anticorps spécifiques de cet antigène viral et qui, par opsonisation des particules virales, vont inhiber son interaction virus-récepteur et donc l'infection des cellules : on parle alors d'anticorps neutralisant. L'opsonisation va également favoriser la phagocytose des particules virales par les leucocytes ou activer le complément contre le virion (phagocytose, lyse de l'enveloppe des particules virales). De même, les lymphocytes T $CD8^+$ par leurs activités cytotoxiques vont lyser les cellules infectées et inhiber la réplication virale[1,154].

3. *La réponse immunitaire spécifique du SNC*

La réponse immunitaire est l'élément majeur et indispensable dans la lutte antivirale de l'hôte, mais sa mise en place conduit à l'induction d'un environnement inflammatoire pouvant conduire à la mort cellulaire, un élément important de la lutte antivirale. Cependant, le SNC est un système biologique délicat dont le tissu est peu renouvelable et qui est central dans la coordination de l'organisme et de son homéostasie[37]. De ce fait, au sein du SNC, la réponse immunitaire est limitée et hautement régulée par de nombreux mécanismes afin de protéger ce dernier de ses effets collatéraux. C'est pour cela que l'on qualifie le SNC de compartiment immunoprivilégié ou de sanctuaire immunologique[36,53,169].

Néanmoins, cette exclusion totale du SNC de la réponse immunitaire périphérique a été récemment revue. La réponse immunitaire du SNC est désormais davantage qualifiée de réponse immunitaire contrôlée : en conditions physiologiques normales, il y a tout de même une immunosurveillance par les cellules immunitaires périphériques, mais celle-ci est fortement réduite et régulée par les différents acteurs du SNC[97,127,170,171]. Cette immunosurveillance reste très localisée, comme à la périphérie des différentes barrières par exemple où elles participent également à leurs fonctions barrières[172]. Par exemple, certaines cellules immunitaires sont présentes dans le compartiment basal de la BHE, comme les macrophages périvasculaires, pour surveiller la présence d'antigènes et de PAMP dans le SNC[169,173]. Ces compartiments aux abords du SNC contiennent principalement des monocytes, des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques[53]. Aussi, d'autres types cellulaires de la réponse immunitaire périphérique peuvent être retrouvés en moindre proportion, comme des lymphocytes B, afin de mettre en place la réponse adaptative à médiation humorale au sein du SNC[53]. Ces compartiments du SNC contenant des cellules immunitaires périphériques sont qualifiés de niche immunologique et sont aux nombres de 3 : le compartiment périvasculaire, la dure-mère des méninges irriguée par le LCR et l'interstitium de la BLSCR[47,52,53,56,58,96,173]. Cependant, de nombreux mécanismes de régulation sont mis en place dans le SNC pour réguler la réponse immunitaire mise en place par ces cellules[97]. En effet, cette régulation est médiée par différents mécanismes des cellules du SNC : l'induction de l'apoptose des lymphocytes T médiée par les astrocytes, la production de lymphocytes régulateurs par les neurones, ou encore le contrôle des populations de lymphocytes dans le SNC par les microglies[127].

En plus de cette immunosurveillance périphérique, les différentes barrières et types cellulaires du SNC vont activement participer à la réponse immunitaire au sein du SNC. La BHE joue un rôle majeur dans le système immunitaire du SNC par restriction de la neuroinvasion : rôle barrière contre les éléments neurotoxiques (pathogènes, toxines, *etc.*), régulation de la transmigration des cellules immunitaires et d'autres médiateurs inflammatoires périphériques vers le SNC, ainsi que l'induction de la réponse immunitaire et inflammatoire (interféron de type I et III, cytokines, chimiokines, *etc.*)[154,164,169,174,175]. Cependant, Il a été démontré que les cellules de la NVU et du SNC jouent un rôle dans la mise en place de la réponse naturelle précoce : les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes, les péricytes, les cellules endothéliales, les neuroprécurseurs, ou encore les microglies. Celles-ci possèdent toutes des PRR permettant l'induction d'une réponse immunitaire naturelle précoce[26,29,82,83,97,176]. La mise en place d'une réponse interféron et d'un contexte inflammatoire

va permettre la coordination des défenses antivirales au sein du SNC, ainsi que la majoration du recrutement de cellules immunitaires périphériques vers le SNC[97,177]. Cependant, l'effet de cette réponse sur la BHE est double : il peut conduire soit à la majoration (cytokines telles que IL-6, TNFα, IL-1β) ou soit à la réduction (IFN de type I et III) de sa perméabilité[174,178,179].

Les microglies sont les acteurs cellulaires principaux de la réponse naturelle précoce du SNC[36,169,180]. Au cours d'une déstabilisation de l'homéostasie du SNC (infection, traumatisme, activité neuronale altérée), les microglies vont induire un état d'activation : celles-ci vont alors subir un changement phénotypique important avec une diminution de la complexité des projections membranaires et un retour à une morphologie amiboïde[35,38,40]. Ces microglies activées deviennent mobiles et peuvent migrer jusqu'à la zone immunogène par chimiotactisme afin de proliférer, mettre en place la protection immunitaire puis permettre la restauration de l'homéostasie du tissu nerveux. En effet, les microglies, tout comme les macrophages, ont une activité phagocytaire leur permettant d'éliminer les pathogènes ou les débris cellulaires déstabilisant l'homéostasie du SNC[35,38,40]. De plus, les microglies sont impliquées dans de nombreux mécanismes de régulation immunitaire au sein du SNC par la sécrétion de cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires, tel que le recrutement des lymphocytes vers le SNC pour la mise en place d'une réponse adaptative ou l'arrêt de la réponse immunitaire après la clairance virale[35,38,39,45,53].

Les astrocytes sont également fortement impliqués dans la mise en place et la régulation de la réponse naturelle précoce du SNC[181,182]. Ils ont notamment 3 rôles majeurs dans la réponse immunitaire : la sécrétion de facteurs immunomodulateurs tels que les cytokines ou les chimiokines, la régulation de la perméabilité de la BHE par leur pieds astrocytaires ou la sécrétion d'IFN de type I, et la formation de cicatrices gliales sur les tissus endommagés[37,180,182]. Etant donné leurs rôles immunomodulateurs et leurs interactions avec la BHE, les astrocytes jouent donc également un rôle sur l'établissement de la réponse adaptative en majorant la transmigration des lymphocytes par exemple[44,62]. Tout comme les microglies, les astrocytes peuvent également adapter un phénotype d'activation. Contrairement aux astrocytes non-activés matures, les astrocytes activés dans un contexte neurodégénératif ou d'inflammation ont une activité de prolifération très importante, appelé astrogliose, et conduisant à la formation de cicatrices gliales dans le SNC. Les cicatrices gliales ont pour but de former une couche cellulaire protectrice, formée par une accumulation de cellules et par la sécrétion d'une matrice extracellulaire de collagène, qui jouera le rôle de barrière contre les cellules inflammatoires et les agents pathogènes au niveau des tissus sévèrement endommagés (infection, nécrose, *etc.*)[42]. Cependant, il a été mis en avant une importante hétérogénéité dans l'activation des différentes populations d'astrocytes, notamment due à la nature du stimulus : en cas de dommage tissulaire important ou d'ischémie cérébrale, il va y avoir une astrogliose de phénotype A2 neuroprotecteur qui conduira à la formation des cicatrices gliales. Ce phénotype permet la clairance des débris cellulaires, la réparation du tissu nerveux ainsi que la réparation de la BHE endommagée (sécrétion de facteur neurotrophique et pro-synaptique)[23,183].

Ainsi, pour conclure, malgré une réponse immunitaire spécifique au SNC médiée par ses propres acteurs (barrières cellulaires, microglies, astrocytes), une communication fine entre le système immunitaire périphérique et celui du SNC est cruciale dans la protection et la

régulation de la réponse immunitaire au sein du SNC[29,47,53,175]. En effet, peu de CPA sont présentes dans le SNC avec peu de possibilités de migration vers le système lymphatique pour la mise en place de la réponse adaptative. Ainsi, la réponse naturelle a un rôle crucial dans le SNC, mais nécessite une communication avec le système immunitaire périphérique pour permettre la mise en place d'une réponse adaptative au sein du SNC. Cette communication est médiée par une immunosurveillance présente dans le SNC ainsi qu'une modulation immunitaire des capacités de transmigration des cellules immunitaires à travers les différentes barrières[127,173]. La rupture de ce privilège immunitaire relatif ou de cette communication peut conduire à la mise en place d'un contexte inflammatoire, d'origine infectieux ou auto-immun, alors lié au déclenchement de pathologies d'ordre neurologiques[169,184].

V. La neuroinflammation et les dommages tissulaires d'origine immunitaire

Les atteintes neurologiques sont liées à une dégradation du tissu nerveux, conduisant à la perte de ses fonctions. Cette dégradation du tissu nerveux, liée à l'altération de la viabilité ou de l'activité cellulaire, est soit d'origine microbienne, c'est-à-dire en lien avec l'activité lytique directe d'un agent pathogène, soit d'origine immunitaire en lien avec les activités neurotoxiques de ses effecteurs conduisant à une neuroinflammation[185]. De ce fait, le déclenchement de pathologies neurologiques par l'activité lytique virale et/ou par la mise en place d'une neuroinflammation importante a été décrit pour de nombreux virus neuroinvasifs et/ou neurotropes tels que WNV, YHV, LACV, HIV, et DENV[186–191]. En effet, certains mécanismes inflammatoires vont conduire à des dégâts tissulaires indirects dans le SNC, un système biologique où le renouvellement cellulaire est très limité. Ainsi, la neuroinflammation va être responsable de 3 mécanismes délétères pour le tissu du SNC[37] : l'activité lytique des cellules immunitaires ciblant les cellules infectées, des mécanismes d'auto-réactions par mimétisme moléculaire des antigènes du pathogène orientant le système immunitaire vers des cellules saines du tissu nerveux, et enfin un effet by-stander des cytokines proinflammatoires induisant l'apoptose et/ou l'activation des cellules voisines non-infectées (Figure 15A)[97,127,147,192]. Ces dégâts tissulaires d'origine immunitaire vont alors majorer l'atteinte tissulaire de l'infection et le déclenchement de pathologies neurologiques[127].

Tout d'abord, de nombreuses cellules du SNC possèdent des PRR et vont être impliqués dans la production de cytokines et chimiokines proinflammatoires au sein du SNC[39,46,83,193,194]. La sécrétion de cytokines et chimiokines va mettre en place et maintenir l'environnement inflammatoire[195,196]. La neuroinflammation qui en découle conduit à l'activation des cellules du SNC, à la production de molécules cytotoxiques comme des espèces réactives de l'oxygène ou directement à la mort cellulaire (TNFα) (Figure 15B)[193,195–198]. De ce fait, la neuroinflammation conduit à une perte des fonctions gliales, fonctions essentielles pour l'homéostasie du SNC[199]. Cependant, cette neuroinflammation est un élément essentiel dans la clairance virale et peut donc également être considérée comme un élément neuroprotecteur. Cette balance entre neurotoxicité et neuroprotection de la neuroinflammation est déterminée par sa durée (activation prolongée des cellules gliales) et par son intensité[193,195,200]. Si la réponse immunitaire est dérégulée ou maintenue sur une longue période, les microglies vont développer une activité neurotoxique et majorer les atteintes neurologiques en maintenant la neuroinflammation ou en perdant leurs activités de support[39,45,193]. De même, activés par les

microglies, par les cytokines sécrétées par les cellules endothéliales, ou par d'autres éléments tels que la privation de nutriments, les astrocytes vont potentiellement se différencier vers un phénotype A1 proinflammatoire et neurotoxique[23]. Ce phénotype est favorisé par le maintien de la neuroinflammation et est défini par une astrogliose, des activités proinflammatoires et une perte des fonctions de soutien des astrocytes majorant alors l'atteinte neurologique[42,201]. Les astrocytes sont ainsi décrits comme des acteurs clés dans la pathogénèse lors des atteintes du SNC[42,46]. En effet, il a par exemple été décrit que l'acquisition de ce phénotypes A1 par les astrocytes lors de l'infection du SNC par le SFTSV majore les dommages tissulaires du parenchyme cérébral[202]. De plus, l'interaction proinflammatoire entre les microglies et les astrocytes peut majorer cette neuroinflammation délétère pour le SNC[45,193,197]. En effet, leurs interactions dans certaines pathologies virales, tel que lors de l'infection par SARS-CoV-2, conduit par une boucle de régulation positive à une sécrétion importante de cytokines et de médiateurs proinflammatoires qui sont corrélés avec le déclenchement accru de pathologies neurologiques[39,88,203].

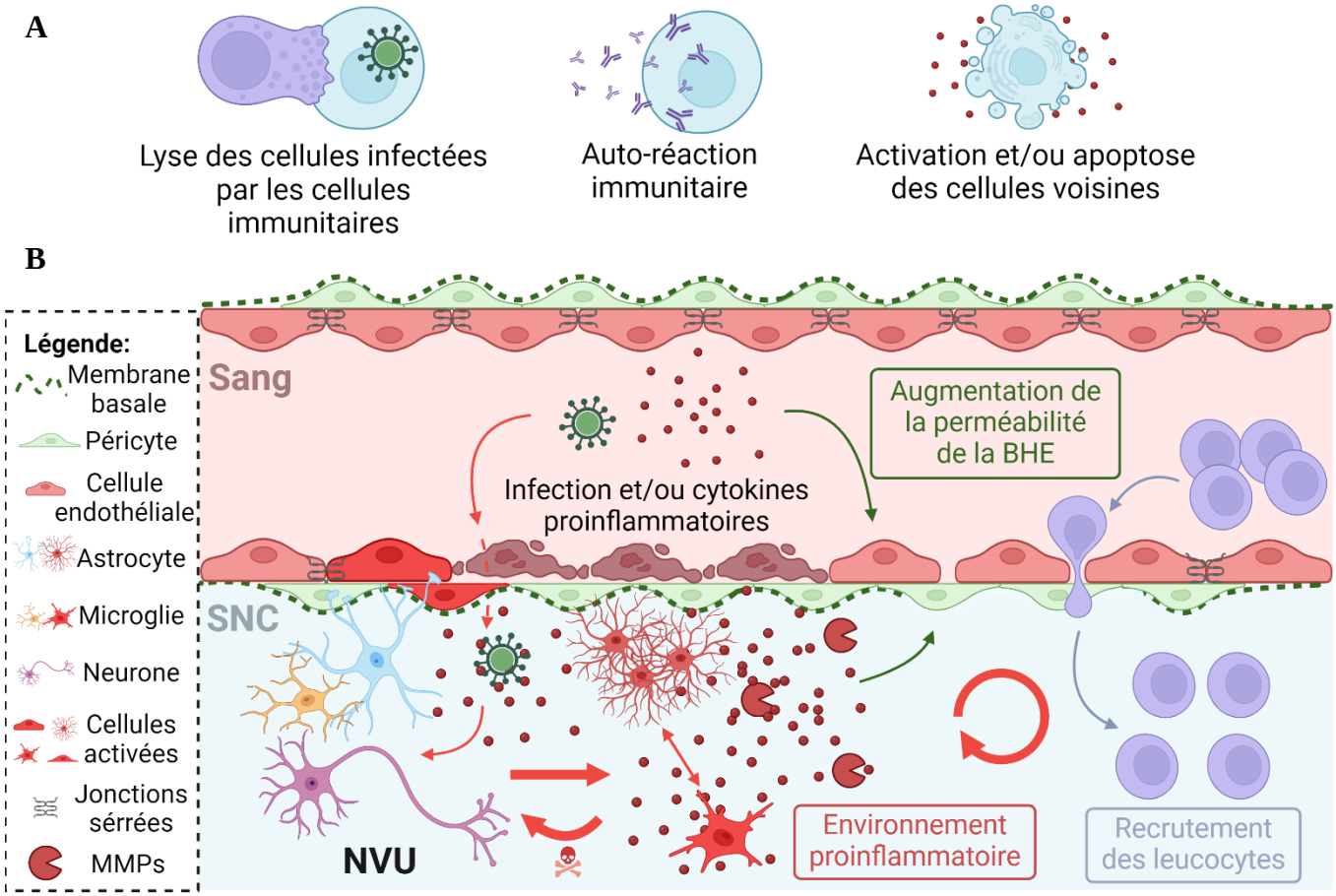


Figure 15 : Les mécanismes de neuroinflammation dans le système nerveux central (SNC). A/ Mécanismes de lyses ou d'atteintes cellulaires d'origine immunitaire. **B/** Mise en place d'une neuroinflammation suite à une inflammation systémique ou une infection virale : les cytokines proinflammatoires ou l'infection de la barrière hémato-encéphalique (BHE) peuvent conduire à l'infection et/ou l'inflammation des cellules de l'unité neurovasculaire (NVU). Si cette réponse perdure dans le temps, elle conduit à la mise en place par les astrocytes et les microglies activées d'un environnement proinflammatoire qui va induire une augmentation de la perméabilité de la BHE et un recrutement accru de leucocytes dans le SNC. Ces 3 éléments (inflammation, recrutement de leucocytes et déstabilisation de la BHE) sont interconnectés et conduisent à la majoration de la neuroinflammation. (MMP : matrix metalloproteases)

La BHE est également largement impliquée dans la mise en place et la majoration de la neuroinflammation. Certaines infections virales de la BHE conduisent à son inflammation et celle de la NVU. Or, la neuroinflammation est un élément important dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE[39,204]. Dans un premier temps, l'infection directe des cellules endothéliales peut conduire à leur apoptose et donc altérer la perméabilité sélective de la BHE. Dans un second temps, certains virus tels que WNV, JEV, MVEV ou NiV induisent la sécrétion dans le système sanguin périphérique ou dans le SNC de cytokines proinflammatoires (TNFα, IL-6, IL-1β), d'enzymes extracellulaires (métalloprotéases), ou de protéines virales (NS1) qui vont favoriser une augmentation de la perméabilité de la BHE. Par exemple, les cytokines proinflammatoires altèrent l'expression, la composition et la dynamique des protéines de jonctions serrées des différentes barrières, telles que la BSLCR et la BHE. De même, la neuroinflammation conduit également à l'activation de métalloprotéases qui altèrent l'intégrité des membranes basales et l'expression des protéines de jonctions serrées[110,134,140,142,144,150–153,205,206]. Certains facteurs sécrétés tels que TGFβ ou ApoE vont également modifier la formation et la composition des membranes basales, influençant alors la perméabilité de la BHE[207,208]. Cette augmentation de la perméabilité de la BHE conduit à une altération de la viabilité cellulaire et des fonctions cellulaires de la NVU, majorant d'autant plus la neuroinflammation[171,174,209–211]. De même, cette ouverture de la BHE, associée à une augmentation de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire par les leucocytes et la BHE, a pour but d'augmenter la leucopédèse vers le SNC afin de faciliter la clairance virale, mais représente également un facteur majeur de la neuroinflammation[61,169,171,174,200]. En effet, ces cellules immunitaires périphériques vont majorer la réponse inflammatoire par la lyse des cellules infectées et par la sécrétion de cytokines et chimiokines[96,196]. Ce mécanisme de neuroinflammation et de dégâts neurologiques a été décrit lors de l'infection du SNC par JEV[212].

Pour conclure, l'induction d'un contexte inflammatoire est essentielle à la clairance du virus du SNC. Cependant, une dérégulation ou le maintien d'un contexte inflammatoire par les différentes cellules du SNC, et notamment par les microglies et les astrocytes, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité de la BHE associée à un recrutement massif des leucocytes périphérique conduisent à une altération d'origine immunitaire du tissu nerveux, majorant alors les atteintes et les symptômes neurologiques[83,144].

Chapitre 3 : Le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Une des arboviroses étant capable d'induire une atteinte du SNC humain est la fièvre de la vallée du Rift (FVR), une fièvre hémorragique d'origine virale sévissant en majeure partie sur le continent Africain. Ce chapitre 3 s'attache à détailler l'état des connaissances globales autour de cette pathologie et de son agent causal, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV pour Rift Valley fever virus). La section suivante a été adaptée de la revue intitulée **Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogénèse** et publiée dans le journal Virologie[213] (Annexe 1).

Le RVFV possède une large gamme d'hôtes, un tropisme multicellulaire et est capable d'infecter de nombreuses espèces de ruminants d'élevage et de la faune sauvage ainsi que

l'Homme[214,215]. Les conséquences sanitaires, socio-économiques et alimentaires liées aux épidémies et/ou épizooties causées par le RVFV sont directes et indirectes. Ces conséquences sont liées aux vagues d'avortements et à la forte mortalité au sein des élevages de ruminants aboutissant à une insécurité alimentaire, et enfin une morbidité chez les populations humaines (Annexe 2)[216–218]. A titre d'exemple, l'épizootie de FVR ayant sévi à Mayotte en 2019 a été responsable d'une chute de production de lait de 20 %[219]. Du fait de ses conséquences multiples, de sa gravité pour la faune domestique, la FVR fait partie de la liste des pathologies animales à déclaration obligatoire par l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA)[220].

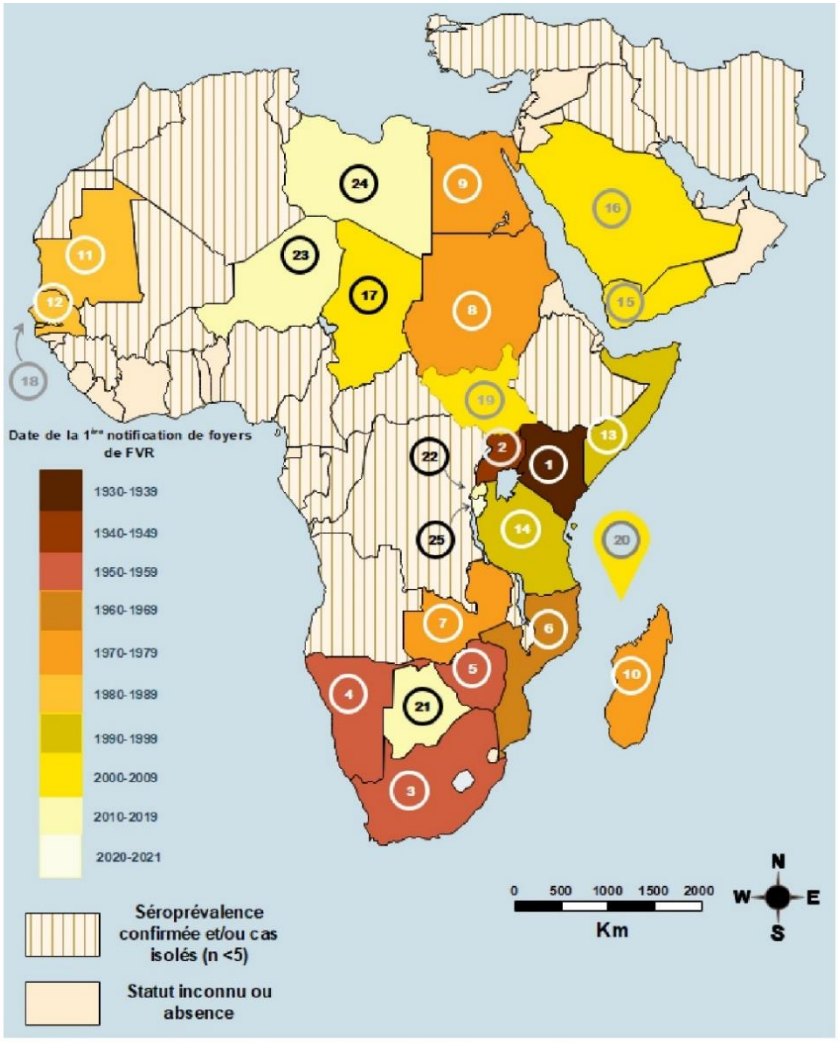
Malgré les graves conséquences sanitaires liées au RVFV, la pathogénèse qui découle de son interaction avec ses différents hôtes est encore très peu maitrisée. Associé à l'absence de traitement thérapeutique en santé humaine, l'OMS a inclus, dans sa liste des pathogènes prioritaires, le RVFV comme un pathogène prototype à potentiel pandémique représentant une urgence de santé publique de portée internationale[221]. De même, pour ces différentes raisons, le CDC a défini le RVFV comme un agent de bioterrorisme de classe A[222]. Aussi, la manipulation de ce virus s'effectue en laboratoire de niveau de biosécurité 3. En France, sa manipulation est également soumise à une réglementation spécifique régie par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé (ANSM). Le RVFV fait en effet partie d'une liste de pathogènes qualifiés de MOT (Micro-Organismes et Toxines) définie par le code de la santé publique (Article L. 5139-1)[223].

I. La distribution spatio-temporelle du RVFV

Depuis sa description en 1930[224], le RVFV a longtemps été considéré comme exclusivement responsable d'épizooties au sein d'élevages de ruminants, telles que celles décrites au Kenya, en Afrique du Sud ou encore en Namibie entre 1931 et 1969[215,225]. Cependant, la première épidémie historique touchant la population humaine a eu lieu en Egypte en 1977, infectant plus de 200.000 personnes et causant a minima 600 décès, faisant alors de la FVR une préoccupation de santé publique[225–227]. A ce jour, la FVR a été décrite dans différents écosystèmes: des zones arides et irriguées, des forêts humides et des savanes sèches[225]. Son expansion est liée aux mouvements de populations (humaines et animales), ainsi qu'aux modifications des aires de répartition, de densité et de diversité de la large gamme de vecteurs biologiques compétents pour le RVFV[215,228]. Ainsi, 25 pays d'Afrique et du Moyen-Orient ont déclaré une épidémie ou épizootie due au RVFV depuis 1930, mais sa circulation, appuyée par différentes enquêtes sérologiques, est avérée dans plus de 40 pays dont la liste est en constante évolution (Figure 16)[214,215,225,227,229–231].

Pour le RVFV, plusieurs facteurs jouent un rôle crucial dans l'émergence et le déclenchement des épidémies/épizooties : la diversité et l'abondance des espèces vectrices ainsi que celles de leurs hôtes mammifères (domestiques et sauvages), le niveau d'immunité des troupeaux au regard du RVFV et les conditions environnementales (température, pluviométrie, végétation)[228,232]. Par exemple, en Novembre 2018, une épidémie de FVR a été déclarée à Mayotte, avec au total 142 cas humains confirmés et de très nombreux foyers animaux. Le déclenchement de cette épidémie a été influencé par plusieurs facteurs agissant de façon concomitante : des précipitations importantes majorant la multiplication des espèces de moustiques compétentes, des mouvements d'animaux (légaux et illégaux) et un niveau d'immunité des troupeaux faible vis-à-vis du RVFV. La présence d'élevages de ruminants

vivant à proximité des populations humaines a également favorisé le déclenchement de cette épidémie[219,233].



Référence sur la carte	Pays ayant déclaré une épidémie/épizootie de FVR	Date de la 1ère notification d'une épidémie/épizootie de FVR	Date des épidémies/épizooties suivantes
①	Kenya	1930	1950-1951, 1968, 1978-1979, 1997-1998, 2006-2007, 2018, 2020-2021, 2024
②	Ouganda	1944	1960, 1962, 1968, 2016, 2018, 2019-2024
③	Afrique du Sud	1950-1951	1969, 1974-1976, 1981, 1996, 2010, 2009-2011
④	Namibie	1955	1974, 2009-2011
⑤	Zimbabwe	1957-1958	1969-1970, 1979, 1989
⑥	Mozambique	1969	2010, 2014
⑦	Zambie	1973-1974	1978, 1985
⑧	Soudan	1973	2006, 2007-2008, 2010, 2018, 2019-2020
⑨	Égypte	1977	1979, 1993, 2003
⑩	Madagascar	1979	1990, 2007-2008,2009, **2021**
⑪	Mauritanie	1987	1993-1994, 1998, 2003, 2010, 2012, 2013-2014, 2015, 2020-2024
⑫	Sénégal	1987	1989, 1993-1994, 1999, 2013-2014, 2020-2024
⑬	Somalie	1997	2007
⑭	Tanzanie	1997	2006-2007
⑮	Yémen	2000	2001
⑯	Arabie Saoudite	2000	2001
⑰	Tchad	2001	2018
⑱	Gambie	2002	2003, 2017
⑲	Soudan du Sud	2007	2019-2024
⑳	France (Mayotte)	2007-2008	2018-2019
㉑	Botswana	2010	2014, 2017, 2020, 2021-2022
㉒	Rwanda	2012	2018, 2022, 2024
㉓	Niger	2016	
㉔	Lybie	2019	
㉕	Burundi	2022-2024	

Figure 16 : Distribution spatio-temporelle de la FVR entre 1930 et 2024. Le dégradé de couleurs représente les décennies durant lesquelles a été notifiée la première épidémie et/ou épizootie liée à la FVR sur un territoire donné. Les pays hachurés correspondent aux pays sans épidémie/épizootie mais où la circulation virale a été décrite directement ou indirectement par des études sérologiques. Le tableau présente une liste des épidémies/épizooties déclarées en Afrique et au Moyen-Orient (adapté de Quellec et al., 2021).

Certains pays ayant déclaré des épidémies ou des épizooties de FVR sont désormais considérés comme des régions endémiques (Kenya, Sénégal, Mauritanie par exemple). En effet, suite à une première émergence, des réémergences irrégulières mais récurrentes y sont observées. Ces émergences et réémergences récurrentes illustrent parfaitement le risque sanitaire actuel que représente le RVFV. En effet, deux épidémies récentes de FVR ont été déclarées en Mauritanie (2022) et en Ouganda (2023) avec un taux de mortalité très variable : l'épidémie de Mauritanie en 2022 a entrainé le décès de 49% des personnes infectées recensées (23 décès/47 cas) alors que celle ayant sévit en Ouganda en 2023 a entrainé une mortalité humaine de 7.2% (13 décès/181 cas)[230]. Ses capacités de dissémination importantes associées à une mondialisation toujours plus présente font que le risque d'expansion du RVFV à d'autres continents est toujours une menace sanitaire sérieuse[234–237]. Il a par exemple été démontré que le nombre d'épidémies liées à RVFV augmente, et que ceci est illustré par l'augmentation de la prévalence humaine du RVFV : 1,92% (1930-1976) à 5,24% (2000-2022)[238]. De plus, 8 cas importés de FVR en Italie ont été récemment décrits chez des patients présentant des symptômes d'arboviroses suite à un voyage en Afrique ou au Moyen-Orient, un facteur supplémentaire majorant le risque d'émergence virale[102,239–241].

II. La phylogénie, la structure et le cycle de réplication du RVFV

Les règles de classification taxonomique virale sont définies par le comité international de la taxonomie virale (ICTV pour International Committee on Taxonomy of Viruses en anglais). La taxonomie virale des virus est en constante évolution, notamment depuis le développement des techniques de séquençage à haut débit (NGS, Next Generation Sequencing), ayant permis de découvrir de nombreux virus[104,242]. Ainsi, le RVFV, dont la taxonomie est définie sur la base de la séquence protéique de sa polymérase L, a subi plusieurs modifications taxonomiques depuis sa description. Brièvement, le RVFV, anciennement classé dans la famille des *Bunyavirales* et dans le genre *Phlebovirus*, a subi plusieurs mises à jour et réassignations phylogéniques par l'ICTV entre 2016 et 2023. A ce jour, le RVFV a été affilié aux rangs taxonomiques décrits ci-dessous[243–246] :

Tableau 2 : Classification taxonomique du RVFV (ICTV, 2024)

Rang taxonomique	Classification
Règne	*Riboviria*
Domaine	*Orthornavirae*
Embranchement	*Negarnaviricota*
Sous-embranchement	*Polyploviricotina*
Classe	*Bunyaviricetes*
Ordre	*Hareavirales*
Famille	*Phenuiviridae*
Genre	*Phlebovirus*
Espèce	*Phlebovirus Riftense*

Comme indiqué dans ce tableau, l'ICTV a adopté depuis 2023 une nomenclature binomiale pour nommer les espèces de virus et a ainsi renommé le RVFV en *Phlebovirus Riftense*. Par simplicité, ce dernier sera nommé RVFV dans ce manuscrit. Un seul sérotype du RVFV est décrit avec différents clades phylogénétiques structurés en fonction des zones

géographiques et des années d'occurrence des épidémies/épizooties. On observe des niveaux de virulence variables en fonction des souches[247–249]. L'évolution des génomes viraux par réassortiment des segments a été décrite : lors de co-infections d'un hôte par différentes souches de RVFV, des échanges de segments peuvent avoir lieu entre celles-ci lors du cycle de réplication virale[248,250,251]. Malgré cette différence de virulence et ce mécanisme de réassortiment, une faible diversité entre les différentes souches (5% de divergence en nucléotides et 2% en acides aminés) est décrite[247,248,252].

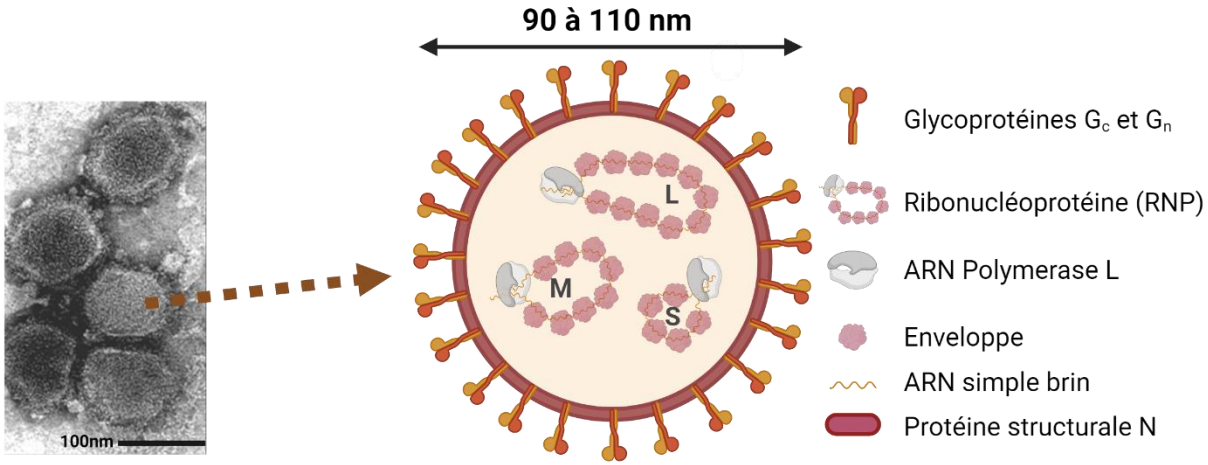


Figure 17 : Particules virales du RVFV obtenues par microscopie électronique à transmission (Freiberg et al., 2008) **et leur organisation** (Adaptée de Quellec et al., 2021).

Le RVFV est un virus enveloppé de forme sphérique avec une taille variable entre 90 et 110 nm[253,254]. Son génome à ARN simple brin de polarité négative est tripartite : le segment L (large) de 6404 nucléotides, le segment M (medium) de 3885 nucléotides et le segment S (small) de 1690 nucléotides. Du fait de la complémentarité des séquences entre les extrémités 5' et 3' de chaque segment, les trois ribonucléoprotéines (RNP) qui composent le génome viral ont une structure tige-boucle pseudo-circulaire[255] (Figure 17). L'enveloppe du RVFV contient des hétérodimères de deux glycoprotéines de surface nommées Gn et Gc[256,257]. Une particularité de cette particule virale est l'absence de capside sous l'enveloppe. En effet, la protection du génome viral est liée à la formation des RNP : par interaction électrostatique, les nucléoprotéines structurales N se lient directement à chaque segment d'ARN et s'oligomérisent. De même, chaque segment est associé à la polymérase L, une ARN polymérase ARN-dépendante nécessaire à la réplication de l'ARN viral[104].

Le cycle de réplication du RVFV débute par son adsorption à la surface cellulaire grâce à l'interaction de sa protéine de surface Gn et son récepteur cellulaire spécifique DC-SIGN, une interaction facilitée par des facteur d'attachements présent à la surface cellulaire tels que d'autres lectine-C spécifiques du foie, les L-SIGN, ou encore les sulfates d'héparanes (Figure 18)[252,258–261]. Cependant, le rôle majeur d'un nouveau récepteur dans l'entrée cellulaire a été récemment décrit : le récepteur LRP1. Ce récepteur appartient à la famille des récepteur LDL régulant de nombreuses fonctions cellulaires dont le métabolisme lipidique. Le récepteur LRP1 est extrêmement conservé entre les espèces et exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme. Ainsi, la découverte de ce nouveau récepteur est une piste intéressante permettant d'expliquer le tropisme cellulaire et le tropisme d'hôte très larges du RVFV[262–264]. Cette reconnaissance va

ensuite conduire à l'internalisation du virion par endocytose selon un mécanisme encore débattu[265,266]. L'acidification de l'endosome tardif va modifier la conformation spatiale de la glycoprotéine Gn et libérer la protéine de surface Gc, une protéine de fusion de classe II qui va conduire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome[267–269]. De plus, certains facteurs cellulaires comme WDR7 et RNASEK seraient potentiellement impliqué dans l'acidification des endosomes et jouerait donc un rôle essentiel et proviral dans l'endocytose du RVFV[270,271]. Cette fusion va permettre la libération des RNP dans le cytoplasme cellulaire et la réplication du génome viral débutera alors immédiatement à ce site de fusion[251,266]. La polymérase virale L présente dans le virion, aidée par certains partenaires protéiques cellulaires ainsi que les régions non-codante des différents segments, va permettre la réplication primaire (transcription des ARN à polarité négative en ARN à polarité positive) puis secondaire du génome viral (transcription des ARN à polarité positive en ARN à polarité négative)[272,273]. De façon concomitante à leurs transcriptions, les ARN viraux à polarité positive sont traduit en détournant la machinerie cellulaire par un mécanisme de vol de coiffe médié par la polymérase L[274]. Cette traduction va conduire à la production des différentes protéines virales et des facteurs de virulence[104,275].

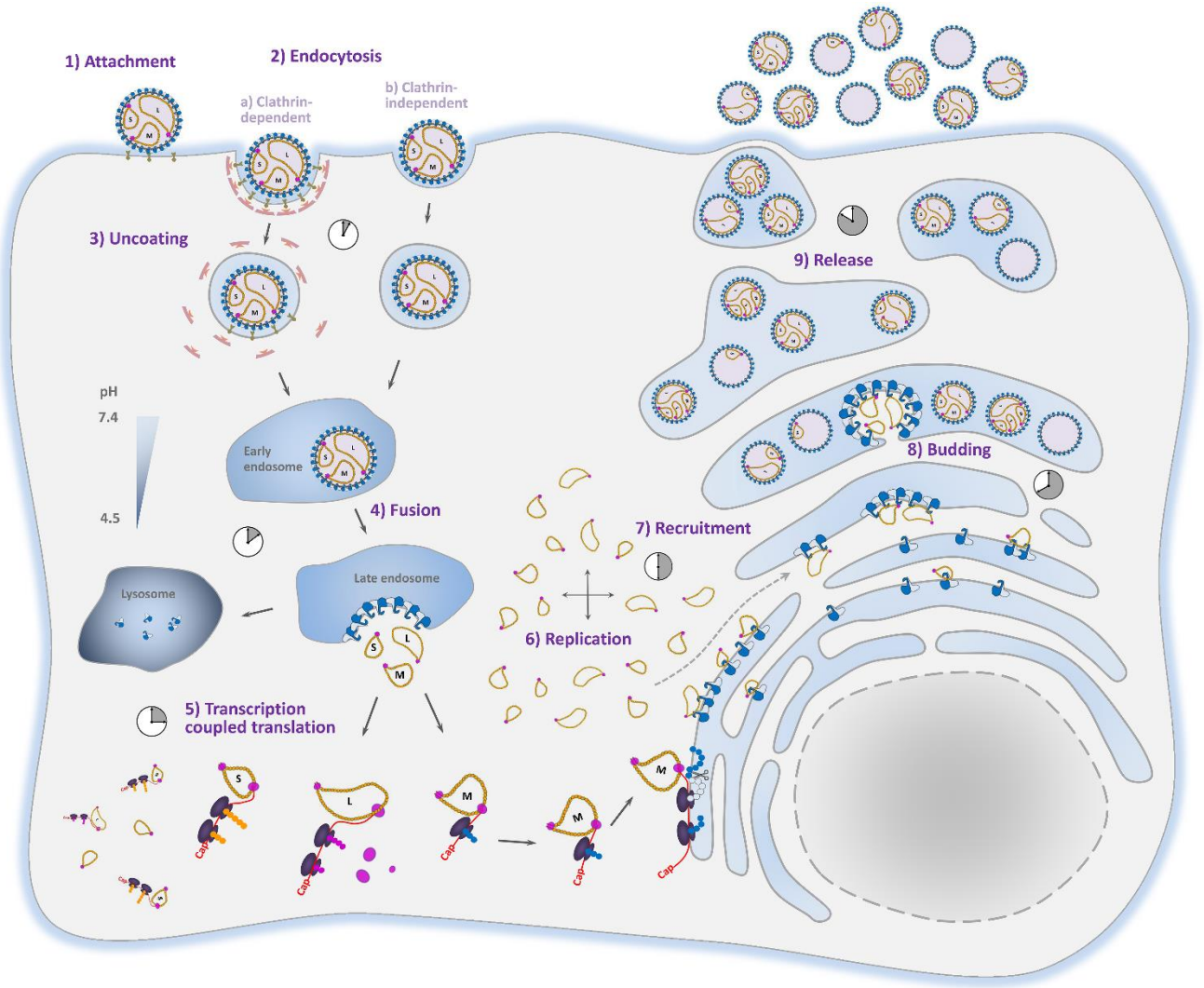


Figure 18 : Cycle de réplication du virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (Schreur et al., 2016).

Cependant, les stratégies d'expression des différents segments d'ARN du RVFV sont différentes (Figure 19). La polymérase L est produite par traduction de l'ARNm issu de la réplication primaire du segment L en ARN à polarité positive. Le segment M va permettre la formation d'une polyprotéine, et par un mécanisme de « leaky-scanning », ou fuite d'initiation, cette polyprotéine aura une taille variable en fonction du codon start utilisé[276]. En effet, ce mécanisme permet de traduire plusieurs cadres de lecture chevauchants de façon indépendante en ignorant un ou plusieurs codons initiateurs de la traduction. Suite à l'action de protéases cellulaires sur les sites de clivage présents sur cette polyprotéine, la traduction du segment M peut conduire à la formation de quatre protéines distinctes : les deux glycoprotéines de surface Gn et Gc et, soit la protéine non structurale NSm, soit la glycoprotéine nommée 78 kDa ou NSm-Gn. Enfin, le segment S, grâce à son caractère ambisens, code pour la protéine structurale N et la protéine non structurale NSs. La régulation de la transcription de chacun des brins du segment S (génomique et antigénomique) est liée à la présence d'une région régulatrice appelé IGR (intergenic region)[277]. La protéine structurale N permet la formation des RNP, et les deux protéines non structurales NSm (par son activité anti-apoptotique) et NSs (par son activité inhibitrice de la réponse immunitaire) sont décrites comme les deux facteurs de virulence majeurs du RVFV[278–281].

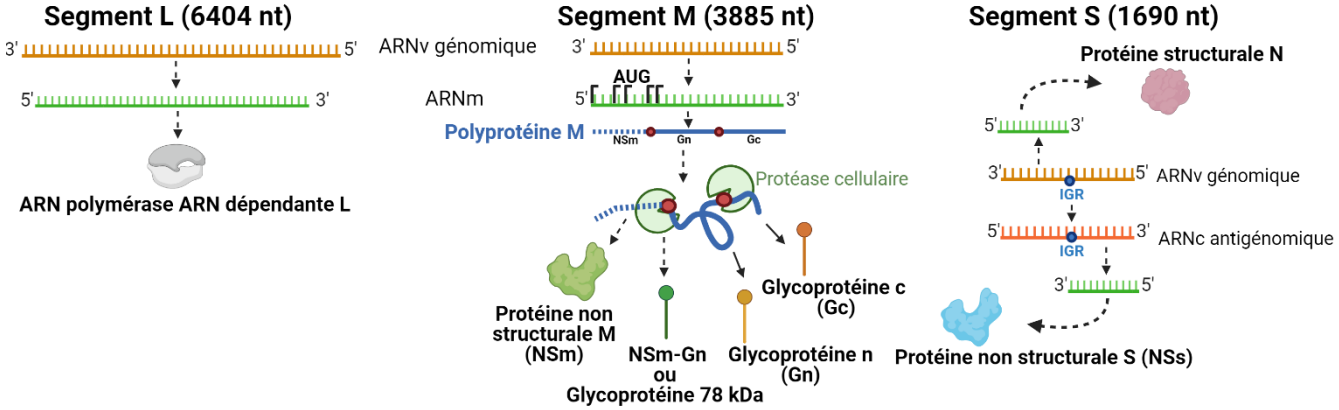


Figure 19 : Représentation schématique de la stratégie d'expression du génome viral. Les ARNs viraux à polarité négative présents dans la particule virale vont être exprimés différemment en fonction du segment. Le segment L va être transcrit en ARNm (en vert) puis traduit pour permettre la synthèse de la polymérase L. Le segment M va également être transcrit en ARNm, qui possède plusieurs codons start (AUG). Par un mécanisme de leaky-scanning (saut de codon start), la traduction de cet ARNm va permettre la formation de la polyprotéine M de taille variable. La présence de sites de clivage (point rouge) sur cette polyprotéine permet, par l'action de protéases cellulaires, de la cliver en plusieurs protéines. Le segment S est ambisens : le brin génomique va permettre la formation d'un ARNm permettant la synthèse de la protéine structurale N et le brin antigénomique va permettre la formation lui aussi d'un autre ARNm, qui permettra la synthèse de la protéine non structurale S (NSs). (Adaptée de Quellec et al., 2021). (IGR : intergenic region, nt : nucléotides)

Suite à leurs productions, les protéines de surface Gn et Gc nouvellement synthétisées vont s'hétérodimériser dans le réticulum endoplasmique, puis être transportées vers l'appareil de Golgi par la machinerie cellulaire et d'autres composants cellulaires telle que la protéine UBR4, puis vont s'enchâsser dans sa membrane[104,282]. Les brins génomiques néoformés et les protéines structurales N vont s'assembler en RNP, puis la protéine N va permettre l'acheminement des RNP vers l'appareil de Golgi, notamment par interaction avec la protéine Gn présente à la membrane du Golgi. La protéine Gn va également induire le recrutement de la protéine L à la membrane du Golgi. Suite à cet assemblage non-sélectif, le bourgeonnement de

la particule virale dans l'appareil de Golgi va avoir lieu, conduisant à la production d'environ 10% de particules virales complètes, enveloppées par la membrane de l'appareil de Golgi. C'est par ce mécanisme d'assemblage non-sélectif que le RVFV peut évoluer par réassortiment[248,251,255,266]. Ces particules virales néoformées vont ensuite être relarguées par exocytose à l'aide des voies de sécrétion cellulaire[251,283]. Ce cycle de réplication complet dure entre 10 à 12h[251,266].

III. Le cycle de transmission du RVFV

La FVR est une arbovirose à caractère zoonotique due à un arbovirus transmis à l'Homme et/ou aux animaux par la piqûre de vecteurs arthropodes hématophages[215,284]. Le RVFV est donc capables de se répliquer chez les vertébrés et certains vecteurs arthropodes[105]. Le cycle de transmission du RVFV fait intervenir différents cycles dépendants de plusieurs facteurs : (i) les conditions environnementales (température, précipitations), (ii) la densité et la diversité des espèces de vecteurs et d'hôtes et (iii) les mouvements de populations d'hôtes (humains et animaux) et des vecteurs (Figure 20)[228].

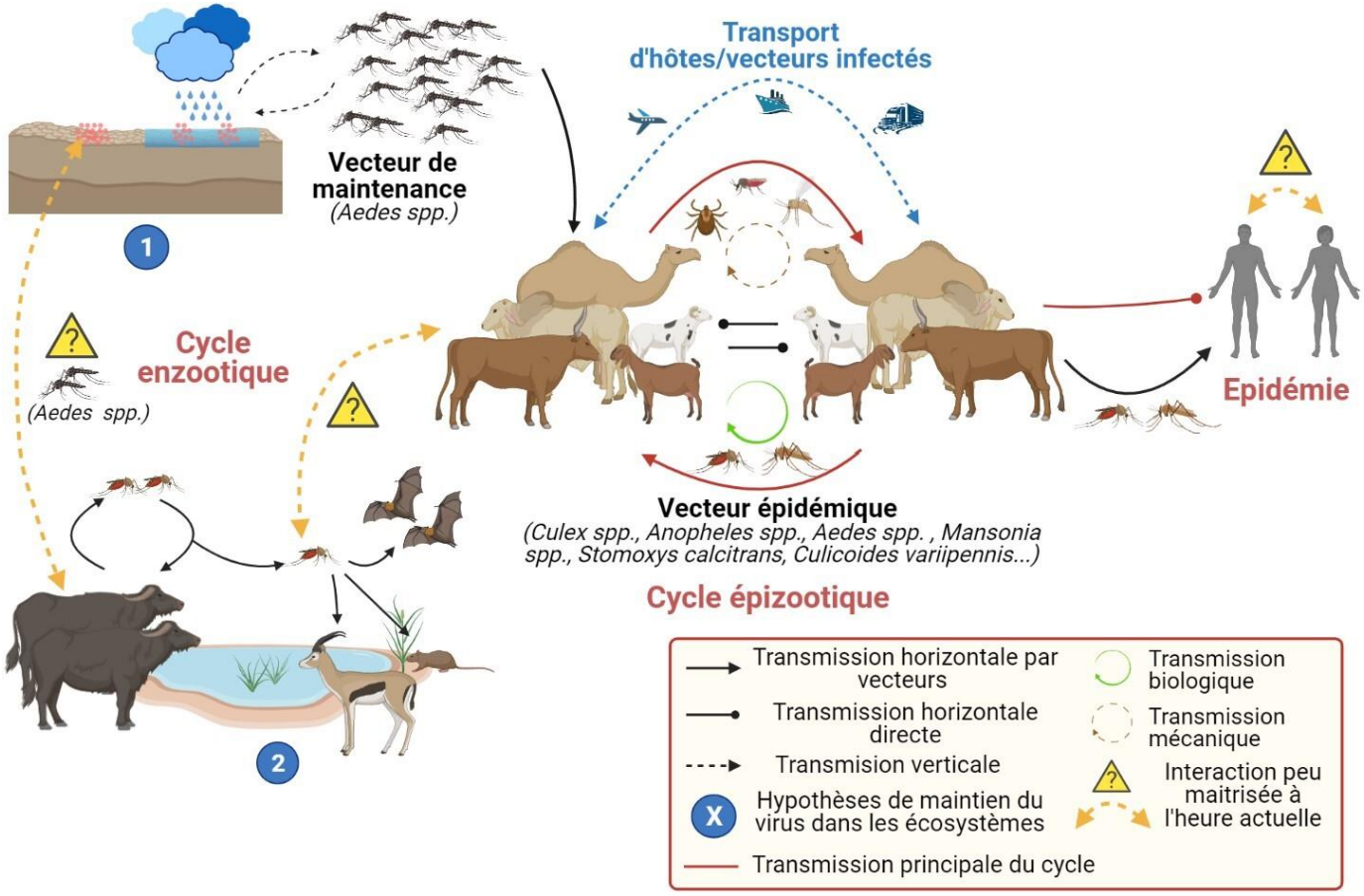


Figure 20 : Représentation schématique du cycle de transmission biologique du RVFV. Au sein du cycle enzootique, il existe deux hypothèses du maintien du virus dans l'environnement entre les épidémies : (1) par transmission verticale chez le vecteur puis dans l'environnement par oviposition chez certaines espèces de moustiques 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 est d'origine environnementale (prolifération des vecteurs *Aedes*) ou anthropique (mouvements de populations). La transmission du virus au sein des élevages par des vecteurs arthropodes épidémiques permet son amplification puis l'établissement du cycle épizootique. La transmission du virus à la population humaine à partir d'élevages infectés (contacts, aliments crus, vecteurs) déclenche une épidémie. (Quellec et al., 2021)

Le virus est maintenu dans les écosystèmes des régions endémiques au RVFV par un cycle enzootique lors des périodes inter-épidémiques/inter-épizootiques. Cependant, les mécanismes de maintien du RVFV sont encore débattus. Une première hypothèse est la transmission verticale du RVFV décrite chez les moustiques du genre *Aedes* ayant un stade larvaire aquatique (par exemple *Aedes mcintoshi* ou *Aedes vexans*) et étant capables de transmettre le virus à leur descendance, maintenant ainsi le virus au sein des populations de vecteurs entre les épizooties par oviposition (dépôts des œufs dans l'environnement)[285,286]. Les œufs d'*Aedes*, très résistants à la dessiccation, sont capables de survivre dans l'environnement pendant plusieurs années (vecteurs dits de maintenance), ce qui expliquerait la maintenance du RVFV dans des territoires arides telles que les savanes sèches[285,287,288]. Une seconde hypothèse est envisagée dans les territoires où la faune sauvage est abondante et diversifiée, avec certains hôtes réservoirs non identifiés qui développeraient une virémie suffisamment importante pour permettre une transmission du RVFV[289]. Plusieurs espèces réservoirs ont été proposées : le buffle Africain, certaines espèces de chauves-souris, ou de rongeurs (*R. rattus*, *A. niloticus*)[289,290]. De plus, certaines de ces espèces présentent des caractéristiques favorisant la dissémination et la transmission du virus: migration, attitude sociale intraspécifique, proximité avec la faune domestique et densité des populations[291–293]. Des modèles prédictifs semblent en faveur d'un équilibre entre ces deux hypothèses, avec notamment le rôle du buffle Africain en tant qu'espèce réservoir, piste qui reste à explorer[292,294].

Le déclenchement d'une épizootie dépend de plusieurs facteurs : (i) la multiplication massive du vecteur de maintenance ou l'introduction d'animaux infectés (par voie maritime/terrestre/aérienne), (ii) la présence de vecteurs secondaires et (iii) la densité d'hôtes sensibles à RVFV sur le territoire concerné et leur niveau d'immunité vis-à-vis du RVFV. La modification des conditions climatiques (augmentation importante des précipitations provoquant inondations et crues) favorise une multiplication massive des vecteurs de maintenance puis la transmission du virus aux élevages de ruminants à proximité[219,226,287,289,295]. Les hôtes mammifères vont alors développer une virémie importante et suffisante pour infecter d'autres espèces de moustiques ainsi que d'autres espèces d'arthropodes hématophages, alors qualifiés de vecteurs secondaires. Ces vecteurs secondaires assurent la transmission horizontale du virus au sein des populations de ruminants domestiques, majorant alors le nombre d'hôtes infectés et deviennent à terme les vecteurs principaux du RVFV à l'origine d'une épizootie[296]. De nombreuses espèces de vecteurs sont impliquées dans ce cycle de transmission du RVFV, qualifié de cycle épizootique, et deux types de vectorisation sont décrits : la vectorisation biologique et la vectorisation mécanique. La vectorisation biologique correspond à une infection spécifique du vecteur permettant une réplication du virus. Quant à elle, la vectorisation mécanique est aspécifique et accidentelle : le virus est transmis horizontalement entre individus par contamination des pièces buccales des arthropodes hématophages lors du repas sanguin sur un individu infecté[284,286,297]. Ce type de vectorisation est assuré par de nombreuses espèces d'arthropodes hématophages, mais nécessite une virémie importante chez l'hôte vertébré infecté, une forte densité d'hôtes infectés et la résistance du virion dans l'environnement[284]. Pour le RVFV, la vectorisation biologique est assurée principalement par les moustiques. En effet, le RVFV a été détecté chez au moins 53 espèces de moustiques[286,296,298,299] avec une compétence vectorielle confirmée chez au moins 47 d'entre elles, appartenant à sept genres différents de moustiques : *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Eretmapodites*, *Psorophora* et *Mansonia*. Néanmoins, la majeure partie des moustiques capables de vectoriser le RVFV est représentée par les genres *Aedes* et *Culex*, et notamment le genre *Aedes* qui semble primordial

dans le cycle enzootique par sa capacité de transmission verticale. De plus, d'autres arthropodes hématophages ont été décrits comme vecteurs mécaniques du RVFV : certaines espèces de phlébotomes, culicoïdes, tiques, stomoxes et glossines[286,296,300]. Ainsi, ces deux types de vectorisation joueraient un rôle dans le déclenchement d'une épizootie/épidémie à RVFV[286,300]. Cependant, la compétence vectorielle est variable en fonction de l'espèce du vecteur arthropode : par exemple, l'espèce *Culex tarsalis* a un taux de transmission de 52 % alors que *Culex pipiens* a un taux de transmission de 8,4 %[299]. La piqûre d'hôtes par des moustiques infectés est la voie principale d'infection des troupeaux de ruminants domestiques. Cependant, certains cas de transmission par contact avec des liquides biologiques infectés (avortons, sang) ont été décrits mais cette voie de transmission reste débattue chez les ruminants[296,301–304].

Le déclenchement d'une épizootie a été décrit comme étant, dans la majorité des cas, responsable du déclenchement d'une épidémie[305,306]. Plusieurs voies de transmission vers l'Homme sont décrites : (i) majoritairement par contact avec des aérosols de liquides biologiques provenant d'animaux infectés (liquides de secrétions générés lors des avortements/abattages (fœtus, sang)), et très probablement par (ii) voie orale (consommation de lait cru ou de viandes crues) et (iii) piqûre de moustiques[232,307]. A ce jour, les transmissions interhumaines horizontale et verticale sont débattues et restent à explorer[305,308–310].

IV. L'infection de la faune sauvage et des vecteurs par le RVFV

Les interactions entre le virus, les espèces animales d'hôtes vertébrés (faune domestique et sauvage) et les vecteurs invertébrés compétents pour le RVFV sont en évolution permanente. De nombreuses espèces de mammifères ont déjà été décrites comme susceptibles à une infection par le RVFV, notamment lors des périodes inter-épidémiques, ceci permettant alors d'envisager les hypothèses de maintien du RVFV dans l'environnement dans un cycle sylvatique. Le niveau de séroprévalence attestant d'une circulation virale au sein de la faune sauvage est très variable (<1% jusque >80%) en fonction des espèces testées et de certains paramètres géographiques et environnementaux (proximité d'une zone endémique ou anciennement épidémique, conditions climatiques). La susceptibilité à l'infection par le RVFV a été démontrée chez les ongulés appartenant à l'ordre des *Artiodactyla* (ordre des mammifères placentaires incluant les ruminants sauvages tels que les antilopes (*Gazella, Eudorcas*), les buffles d'Afrique (*Syncerus caffer*) et les cerfs de Virginie), l'ordre des *Chiroptera* (chauve-souris), l'ordre des *Rodentia* (rats, hamsters, souris), les primates non-humains, les Equidés ou encore certains Félidés[289,290,311–315]. Cette liste non-exhaustive illustre la large gamme d'hôtes susceptibles à l'infection par le RVFV. Les reptiles, amphibiens et les oiseaux ne semblent, quant à eux, pas être des espèces-hôtes du RVFV, malgré que la permissivité *in vitro* au RVFV de lignées cellulaires d'amphibiens et reptiles a été confirmée récemment[215,316]. Malgré cet important spectre d'hôtes, la pathogénèse liée au RVFV est peu étudiée au sein de la faune sauvage, où l'infection est considérée comme asymptomatique, notamment chez les chauves-souris, ou peu symptomatique (syndrome fébrile avec faible niveau de mortalité)[290]. Néanmoins, des cas d'avortements ont pu être décrits chez les buffles d'Afrique en phase aiguë de la maladie avec une virémie importante et persistante observée 48h à 72h après infection, et chez deux espèces d'antilopes en captivité : *Antidorcas marsupialis* et *Damaliscus dorcas*[289,291,317,318].

Comme décrit précédemment, les moustiques sont les vecteurs biologiques ayant un rôle central dans les différents cycles de transmission du RVFV et leurs infections semblent

asymptomatiques. En effet, il semblerait que, *in vitro*, l'infection des cellules de moustiques C6/36 (*Aedes albopictus*) par le RVFV n'induise pas d'effet cytopathique majeur, mais les mécanismes d'interactions moléculaires entre le virus et ses vecteurs sont peu décrits[319]. Néanmoins, certaines caractéristiques spécifiques de l'interaction moustique-RVFV ont pu être mises en avant. Premièrement, il a été montré que la protéine NSm, et plus probablement la synthèse de la glycoprotéine 78 kDa seulement produite lors de l'infection de cellules de moustiques (C6/36), jouerait un rôle primordial dans l'interaction du virus avec le moustique ainsi que dans la virulence du RVFV envers les cellules des hôtes mammifères[319–321]. Deuxièmement, la réplication du RVFV ainsi que l'expression de son facteur de virulence NSs est régulé par ARN interférence chez les cellules de moustiques du genre *Aedes* (Aag2, U4.4)[322–324]. Troisièmement, l'alternance d'hôtes est cruciale pour la stabilité génomique et impacte la virulence via l'acquisition de certains facteurs (N-Glycosylation liée à la maturation de l'enveloppe dans l'appareil de Golgi, nature et composition lipidique de l'enveloppe) mais les mécanismes moléculaires restent très peu décrits[323,325,326].

V. La physiopathologie associée à l'infection par le RVFV en fonction de l'hôte

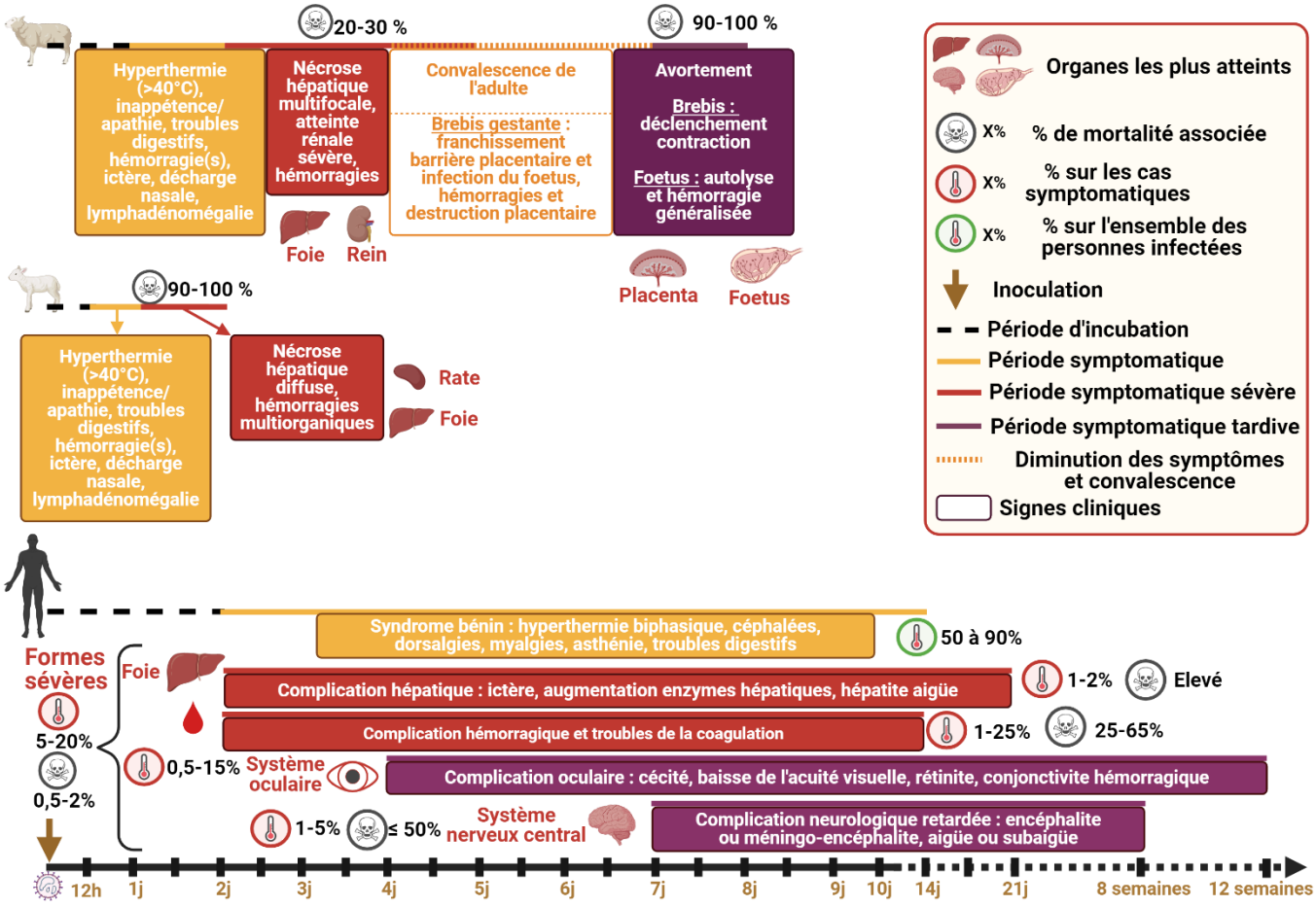


Figure 21 : Représentation de la cinétique et de la symptomatologie associées à l'infection par le RVFV en fonction de l'espèce : mouton, agneau puis humain (de haut en bas) (Adaptée de Quellec et al., 2021).

L'épizootie se traduit chez les bovins, caprins, ovins et camelins par une vague d'avortements, une forte mortalité des jeunes animaux et une mortalité plus modérée des animaux adultes[327,328]. La susceptibilité et la sévérité de la pathologie liée au RVFV sont variables en fonction de l'âge et de l'espèce de l'hôte infecté. L'espèce ovine est

particulièrement sensible à l'infection, avec une mortalité subite chez les adultes allant de 20 à 30 %, et des avortements chez 90-100 % des brebis gestantes[252,329]. Chez le mouton adulte, les symptômes les plus fréquents sont un comportement apathique, une inappétence, des troubles digestifs (vomissements, diarrhées), des douleurs abdominales, un ictère, une hyperthermie importante (>40°C), une décharge nasale, une lymphadénomégalie, et des diarrhées hémorragiques (Figure 21). La mortalité des adultes est due à trois atteintes principales : une nécrose hépatique multifocale, une atteinte sévère des tubules rénaux et des hémorragies multiples (hépatique, rénale, intestinale) avec une atteinte multi-organes[330]. Une nécrose de la rate associée à une leucopénie, une atteinte des ganglions lymphatiques et une atteinte du tractus intestinal peuvent également être observés. On retrouve une variabilité de la pathogénèse et de la sévérité de l'infection à RVFV chez le mouton en fonction de l'âge. En effet, les jeunes animaux (< 1 mois) sont très susceptibles à l'infection par le RVFV avec des taux de mortalité de 90 à 100 %[331]. Les signes cliniques observés chez le jeune mouton sont plus sévères que chez l'adulte avec une atteinte majeure du foie et de la rate ainsi qu'une production de particules virales plus intense. Comme chez l'adulte, l'infection des organes lymphoïdes induit une leucopénie. L'atteinte du foie est liée à une nécrose hépatique diffuse débutant par des foyers de nécrose primaire aléatoire dès 12h post-infection, associée à des hémorragies hépatiques sévères. Des antigènes viraux sont détectés dans de nombreux tissus et associés à des hémorragies multi-organes.

Chez les espèces caprine, bovine et cameline, les signes cliniques observés sont très proches de ceux observés chez les ovins (avortement, atteinte hépatique sévère, hémorragies et leucopénie), avec toutefois un taux de mortalité et une sévérité des signes cliniques plus modérée[327]. Chez les caprins, après une période d'incubation de 24h, la virémie est d'une durée plus courte et les titres viraux sont moins importants[252,332]. L'infection des chèvres adultes conduit ainsi à une mortalité retardée après 9 et 70 jours post-infection (10 %)[325,328]. La mortalité observée chez les jeunes caprins est similaire à celle retrouvée chez les agneaux (70 à 100 %) et la vague d'avortements lors de l'infection du troupeau atteint également la même sévérité[328]. De même, les bovins ont une susceptibilité nettement moins marquée à l'infection par le RVFV. L'hyperthermie ne persiste que quelques jours (1 à 4 jours), malgré une virémie détectable dès 24h post-infection[215,333]. Ainsi, le taux de mortalité des adultes est évalué à seulement 5-10 % et celui des veaux est plus variable en fonction de leur âge (10-70 %)[252,327,334]. Comme chez les autres ruminants, l'infection provoque un niveau élevé d'avortements chez les femelles gestantes (30-40 %)[335,336]. Pour finir, la perception de l'espèce cameline, initialement décrite comme une espèce peu sensible au RVFV, a radicalement changé depuis 2010, où de fortes mortalités ont été observées en Mauritanie chez les adultes et les jeunes animaux avec des formes aiguës similaires à celles des autres ruminants[226,327,337].

Une importante variabilité à la fois dans les formes graves et dans le taux de mortalité est observée au sein des populations humaines dans chaque épidémie. Le taux de mortalité varie entre 0,5 et 2 %, mais peut atteindre des valeurs plus importantes, comme celui de 49% décrit lors de l'épidémie d'Ouganda en 2023[230]. L'infection est parfois décrite comme asymptomatique, mais dans la plupart des cas (50 à 90 %), l'apparition d'un syndrome grippal bénin survient après 2 à 6 jours d'incubation et peut durer jusque 2 semaines. Ce syndrome grippal se manifeste par des céphalées, des myalgies, des dorsalgies, une hyperthermie biphasique (48h d'hyperthermie suivie d'un rebond un à trois jours après) et des troubles digestifs[214](Figure 21). Parmi ces cas symptomatiques, il est décrit entre 5 et 20 % de formes graves avec des complications hépatiques, neurologiques, oculaires ou hémorragiques qui sont

associées à une mortalité plus élevée[214,338–340]. Un dysfonctionnement hépatique se manifeste par un ictère, une augmentation des enzymes hépatiques sanguines et dans les formes graves, par une hépatite aiguë (1 à 2 %) et par la présence de nécroses hépatiques[305]. Associés à ces troubles hépatiques, on observe également des troubles de la coagulation (coagulopathie intravasculaire diffuse, thrombose, thrombopénie, fibrinolyse) et l'apparition de complications hémorragiques dans 1 à 25% des cas symptomatiques, avec parfois des thromboses multiples (phlébites, infarctus)[341,342]. Les hémorragies associées au RVFV sont multiples (épitaxie, gingivorragie, hématurie, …) et la mortalité associée peut atteindre 65%[214]. Les atteintes neurologiques dont la prévalence est très variable sont une forme de complications retardées : elles apparaissent entre 1 et 4 semaines après l'infection, et parfois même après 60 jours post-infection. Ces atteintes sont décrites sous deux formes : une forme aiguë et une forme subaiguë[343]. Ces formes neurologiques sont dues au déclenchement d'une encéphalite, ou d'une méningo-encéphalite, provoquant des manifestations cliniques multiples telles que des céphalées intenses, un déficit neurologique, une rigidité de la nuque, des hallucinations, des pertes de mémoire, des convulsions ou un coma par exemple[214,343]. Les complications oculaires peuvent être uni ou bilatérales et leur incidence est très variable (0,5 à 15 %)[214]. Elles se manifestent par une diminution de l'acuité visuelle, un scotome, une conjonctivite hémorragique, des douleurs rétro-orbitales, une angiopathie (vascularite, occlusions) et le plus fréquemment observé, une rétinite liée à des lésions nécrotiques du tissu oculaire[343]. Les lésions oculaires actives et aiguës se régénèrent en dix à douze semaines et 40 à 50 % des cas évoluent vers une diminution permanente de l'acuité visuelle dont une grande proportion vers une cécité définitive (jusqu'à 50 %)[214,338,344]. Un dysfonctionnement de multiples organes et un dysfonctionnement rénal (hypovolémie, hyperémie, créatinine élevée) peuvent également être observées. Chez l'Homme, l'infection par le RVFV n'a pas encore été décrite comme entrainant une augmentation du risque d'avortements chez les femmes enceintes, mais cela reste encore à l'heure actuelle très débattu[295,309,345–347].

VI. La pathogénèse du RVFV et les modèles animaux

Dans le but de caractériser plus précisément les mécanismes d'interactions entre le RVFV et ses différents hôtes, et notamment la pathogénèse induite par cette infection, de nombreux modèles animaux ont été utilisés : certaines espèces de rongeurs (souris, rat, hamster), des primates non-humains (PNH) ou encore certains ruminants (moutons, agneaux, veaux)[334,343,348–350]. Selon le modèle animal utilisé, étant donné le caractère espèce-dépendant de la sensibilité à l'infection par le RVFV, les mécanismes d'infection peuvent différer. Le tropisme hépatique majoritaire avec le développement d'une nécrose hépatique est cependant une caractéristique commune entre toutes les espèces infectées par le RVFV, y compris l'Homme[226,252,295,331,351]. De même, le tropisme multicellulaire du RVFV est retrouvé chez tous ses hôtes avec de nombreux types cellulaires infectés tels que les hépatocytes, macrophages, épithélium rénal, endothélium vasculaire, ou encore les cardiomyocytes par exemple[214,330,352,353]. Différentes voies d'inoculation peuvent être utilisées: par injection intradermique ou sous-cutanée (mimant la transmission vectorielle), par piqûre de moustiques, injection intrapéritonéale ou encore par aérosol[325,332,334,343,348,353–356]. Cependant, la voie d'inoculation utilisée peut influencer la sévérité des symptômes : par exemple, l'inoculation par aérosols (mimant la transmission directe) semble majorer la sévérité chez le modèle murin en favorisant les formes neurologiques[355,357,358] (Figure 22A).

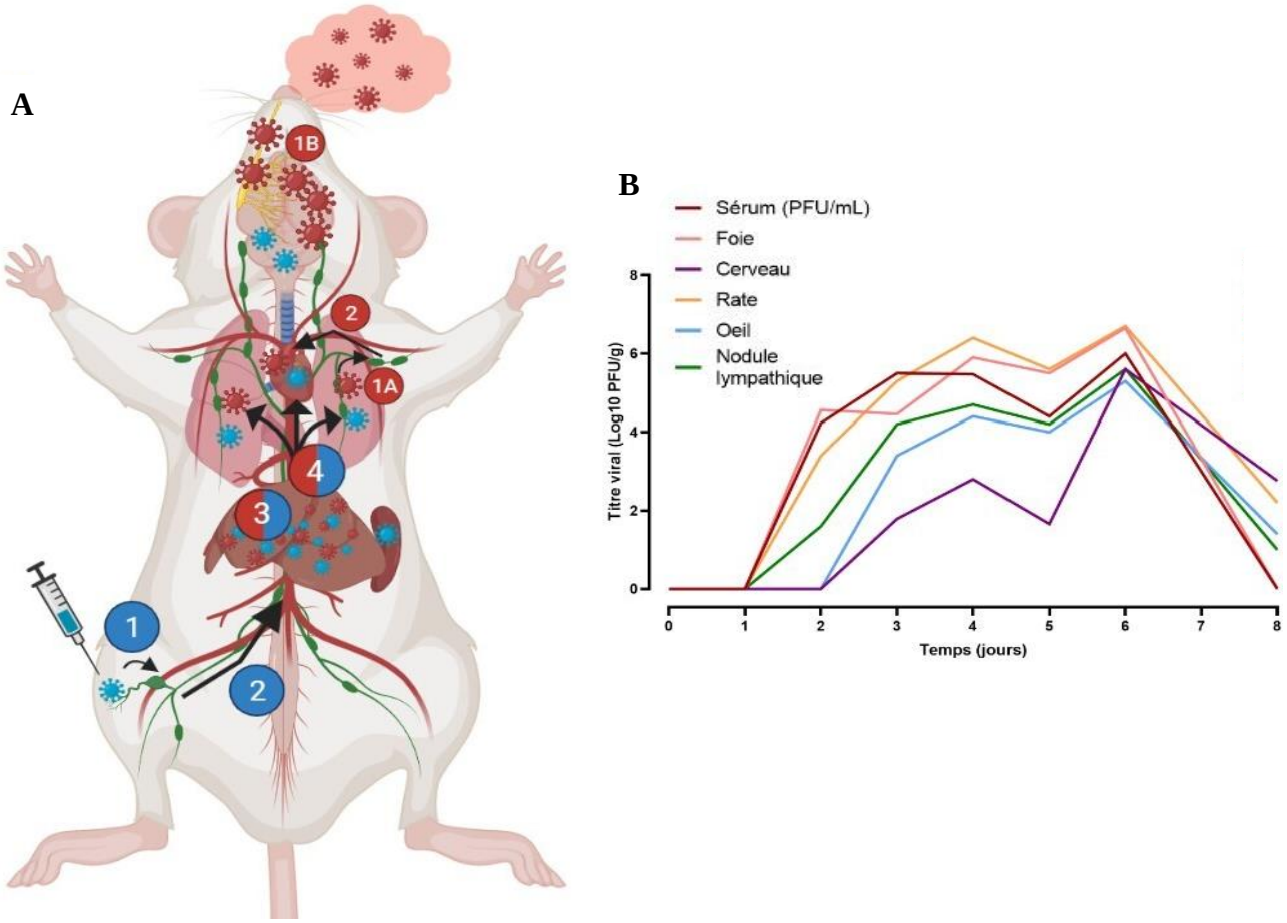


Figure 22 : Cycle de multiplication du RVFV chez le modèle murin. A : Cinétique d'infection du RVFV chez le modèle murin inoculé par voie intradermique (bleu) ou par aérosol (rouge). Phase précoce : par voie intradermique, le RVFV infecte les cellules de l'immunité naturelle de la peau (cellules dendritiques, macrophages) (1) et par aérosols, il infecte les cellules de l'immunité naturelle résidentes du tissu pulmonaire (1A) mais atteint potentiellement le système nerveux en infectant le nerf olfactif (1B). Indépendamment de la voie d'exposition, il est ensuite acheminé vers les ganglions lymphatiques puis rejoint la circulation sanguine pour atteindre les organes cibles dont le foie (2). Phase hépatique : production intense de virions dans le foie, indépendamment de la voie d'exposition (3). Phase tardive : La réplication du RVFV au niveau hépatique augmente la dissémination par voie hématogène du virus vers les tissus secondaires (cerveau, œil, cœur …), majorant alors la charge virale et la réplication du virus dans ces tissus (4). **B** Evolution de la charge virale en fonction des tissus au cours du temps après infection par le RVFV chez le modèle murin (Adaptée de Smith et al., 2010). (Quellec et al. 2021)

La majorité des connaissances associées à la pathogénèse du RVFV est issue des travaux réalisés sur les modèles animaux, et notamment les modèles rongeurs (souris et rat). En effet, les souris infectées développent une symptomatologie proche des hôtes naturels et sévère avec 50% des souris qui décèdent 4 jours post-infection d'une atteinte hépatique létal associée à des hémorragies puis 100% des souris survivantes qui décèdent 8 jours post-infection d'une atteinte neurologique tardive (méningo-encéphalite)[349,353]. Chez le modèle murin, trois phases dans l'infection ont été rapportées[348,353,359] (Figure 22A/B) :

1) La phase précoce (<24h post-infection) correspond à la primo invasion des tissus par le RVFV lors de son entrée. Le virus est confronté aux cellules de la réponse immunitaire naturelle du derme de l'hôte mammifère (infection par piqure de moustique) ou du tissu pulmonaire (infection par aérosol) : les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que le RVFV est capable d'infecter les macrophages et les DCs, notamment à l'aide du récepteur DC-SIGN chez la souris, mais également chez l'Homme[259,352,356,360]. Probablement corrélée à l'infection des leucocytes, il y a induction en phase précoce d'une lymphadénopathie et d'une leucopénie, notamment une diminution

significative du nombre de lymphocytes[328,348,352,353,359]. Grâce à ces premières cellules infectées, le virus va se propager vers les ganglions lymphatiques via le système lymphatique puis rejoindre le compartiment sanguin. En se disséminant par cette voie hématogène, de nombreux organes seront atteints : foie, rate, reins, cerveau et poumons.

2) La phase hépatique (24h-48h post-infection) correspond à la phase de réplication massive du virus dans les hépatocytes, tropisme majoritaire du RVFV. L'infection du foie induit une altération sévère de la fonction hépatique. Chez les survivantes, un pic de réplication virale à 6 jours post-inoculation est observé puis une diminution progressive de la charge virale jusqu'à un niveau non détectable dans le foie ou le sang.

3) La phase tardive (> 48h post-infection) est liée à une majoration de la virémie suite à la réplication hépatique et correspond à l'augmentation retardée de la charge virale associée aux tissus secondaires (cerveau, cœur, pancréas, ovaires) se manifestant donc par des symptômes tardifs. En effet, certains compartiments décrivent une augmentation de la charge virale plus tardivement comme le cerveau, 3 jours post-inoculation, avec un développement de signes neurologiques plus tardifs (8 jours post-inoculation) engendrant une encéphalite tardive, des hémorragies cérébrales et des paralysies[352,353,358].

Plusieurs aspects de la pathogénèse du RVFV chez l'Homme et chez les ruminants ont pu être explorés grâce au modèle murin. Dans un premier temps, le rôle de la phase hépatique dans la majoration de la pathogénèse, et notamment par une augmentation de la virémie et de la charge virale associée aux différents organes, a pu être mise en avant[361]. Dans ce sens, il a été démontré que la sévérité des symptômes et de la pathogénèse est corrélée à la charge virale chez l'Homme[341,362]. Dans un second temps, la pathogénèse conduisant aux multiples hémorragies reste à ce jour encore peu comprise. L'infection des hépatocytes induit une déstabilisation de l'architecture du foie et donc une perturbation de sa fonction biologique[353].Or, le foie est responsable de la synthèse de certaines protéines de la coagulation. La diminution de cette synthèse induit la formation de caillots sanguins disséminés, qui vont séquestrer les facteurs de coagulation, et induire une perturbation du système de coagulation systémique, se manifestant alors par des hémorragies et thromboses (CIVD : coagulopathie intravasculaire disséminée)[351]. Ce défaut de coagulation est également retrouvé chez l'Homme et pourrait conduire aux formes hémorragiques[341]. D'autres pistes comme l'atteinte directe de l'intégrité de l'endothélium vasculaire par l'infection virale ou le rôle de l'inflammation systémique restent encore à explorer[363].

Un autre aspect de la pathogénèse du RVFV peu maitrisé est le mécanisme responsable des effets cytopathogènes. Pour cela, l'étude histologique des tissus infectés a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de mort cellulaire associés à l'infection. En effet, les nécroses observées seraient d'origine lytique directement liée à l'infection virale, mais également apoptotique (corps apoptotiques, rétrécissement cellulaire, pycnose) accompagnées d'un processus inflammatoire avec infiltration de cellules proinflammatoires (macrophages et neutrophiles) dans les organes infectés tels que le foie [226,328,331,338,353,364–366]. Ainsi, il est possible que la réplication virale induise des mécanismes de pyroptose et nécroptose, des apoptoses cellulaires immunogènes. La pyroptose est un mécanisme de réponse antivirale primaire résultant de l'activation des récepteurs intracellulaires NLRP3 et lié à la signalétique d'apoptose

caspase-dépendante. Néanmoins, le RVFV possède un facteur de virulence capable d'inhiber l'apoptose via la protéine NSm qui cible la membrane externe mitochondriale. Les cellules infectées peuvent alors mettre en place une mort cellulaire programmée autre, la nécroptose, afin de contourner l'action inhibitrice de la protéine NSm[166,348,367,368].

Le rôle de la réponse immunitaire de l'hôte dans la résistance et/ou la majoration de la pathogénèse du RVFV en participant à la nécrose tissulaire reste encore à explorer. L'étude du rôle de l'immunité dans la résistance à l'infection par le RVFV a parfois entrainé des conclusions contradictoires. Tout d'abord, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce, de la réponse IFN de type I, ainsi que la production d'anticorps neutralisants ciblant la protéine de surface Gn sont décrits comme nécessaires à la survie de l'hôte lors d'une infection par le RVFV[215,325,349,369–374]. Dans les formes graves, plusieurs études décrivent une inhibition de la réponse inflammatoire et IFN de type I corrélée à une augmentation de la charge virale[342,370,375]. Ces études émettent l'hypothèse que la diminution de l'expression de cytokines et chimiokines proinflammatoires (CCL5, sCD40L, GRO), ainsi que l'augmentation de la synthèse de cytokines et chimiokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1RA) sont liées à une augmentation de la charge virale et donc une sévérité accrue de l'infection[342,375]. Dans les formes sévères chez la chèvre, le RVFV inhibe efficacement la mise en place de cette réponse immunitaire : (i) l'infection des organes lymphoïdes induit une leucopénie, et (ii) le facteur de virulence NSs du RVFV inhibe l'expression des IFN de type I et de certaines cytokines proinflammatoires (TNFα)[279,281,325,375]. Chez les chèvres survivantes à l'infection par le RVFV, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce (IL-12) et tardive (TNFα, IL6, IL-1β) associée à une réponse IFN de type II (IFNγ) est observée[325]. Cette réponse IFN de type II aurait un rôle indirect sur la réponse antivirale en permettant l'activation des cellules NK cytotoxiques et permettrait une résistance à l'infection en contournant l'inhibition de la réponse immunitaire par le RVFV[325]. Par ailleurs, d'autres auteurs ont mis en avant une surexpression des cytokines et chimiokines proinflammatoires telles que l'IL-8, CXCL9, CXCL10, CCL2 et anti-inflammatoires telle que IL-10 dans les formes fatales murines et humaines de FVR et ont donc fait l'hypothèse que la sévérité de la pathologie serait liée à une dérégulation de la réponse immunitaire (tempête cytokinique)[341,359,376]. De même, lors de l'infection des hépatocytes de souris par le RVFV, on observe leur apoptose accompagnée d'une augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires, des facteurs pro- et anti-apoptotiques ainsi qu'une infiltration de neutrophiles dans le foie[364]. La mise en place de cette inflammation pourrait être à l'origine de la nécrose hépatique. Ainsi, à l'heure actuelle, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce semble primordiale pour la résistance à l'infection, mais sa dérégulation pourrait être corrélée à une majoration de la sévérité. Certains auteurs ont même suggéré que l'analyse de certaines de ces cytokines soient utilisés comme marqueurs des formes sévères[376].

Un dernier aspect peu maitrisé est la variabilité inter-individuelle de la sévérité de l'infection par le RVFV. Cette variabilité serait liée à l'action des facteurs de virulence de la souche virale impliquée, telles que les protéines NSm et NSs, ainsi qu'à des facteurs de susceptibilité de l'hôte. Parmi ces facteurs, certains semblent favoriser le développement d'une forme sévère : un mode de vie ou de travail associé aux élevages de ruminants, une co-infection (HIV, hépatite C), une comorbidité (cirrhose), mais également certaines caractéristiques liées à la réponse immunitaire naturelle[295,307]. Le rôle du polymorphisme génétique lié à des fonctions

immunitaires dans la variabilité de la virulence a été décrit. En effet, certains auteurs ont décrit que les formes graves associées au RVFV chez l'Homme étaient corrélées à un polymorphisme des récepteurs et facteurs signalétiques de l'immunité naturelle (TLR3, TLR7, TLR8, Myd88, TRIF, MAVS, et RIG-1), validant alors un rôle génétique et immunitaire dans la résistance à l'infection par le RVFV[377]. Ces facteurs génétiques et immunitaires ont également été décrits chez la souris : certains locus ont été associés chez certaines souris à une susceptibilité accrue à l'infection par le RVFV[378–380]. L'âge pourrait également être un facteur de variabilité du fait de la maturation et de la fonctionnalité du système immunitaire.

VII. Le diagnostic et les moyens de luttes et de préventions contre la FVR

Les premiers signes cliniques observables d'une épizootie de FVR sont très souvent une vague d'avortements dans les troupeaux de ruminants domestiques associée à une mortalité élevée des jeunes animaux et modérées chez les adultes[327]. Différentes techniques et méthodes de diagnostic de laboratoire ont été développées pour confirmer ce diagnostic clinique chez les animaux, ainsi que chez l'Homme[215,381] :

1) La détection du génome viral par biologie moléculaire est recommandée pendant la phase précoce de l'infection (1 à 6 jours post-infection) à partir de sérum ou échantillons sanguins si l'infection est aiguë et que le niveau de virémie est suffisant pour détecter le RVFV, ou à partir de tout autre organe issu de biopsies quand l'animal ou le patient sont décédés. Cette détection spécifique est réalisée par RT-PCR ou par RT-qPCR puis confirmée si possible par l'isolement et la caractérisation phylogénétique du virus en cas de charge virale élevée[215,382,383]. Par ailleurs, plusieurs outils de diagnostic rapide applicables sur le terrain ont été développés : de la bandelette immuno-chromatographique, à la RT-PCR isotherme, ou encore la technique de RT-ddPCR[384–390].
2) La détection sérologique par la technique d'ELISA ou par la technique de séroneutralisation virale permet la détection des anticorps anti-RVFV dans les échantillons de sérums pour évaluer une infection ancienne (IgG) ou récente (IgM) par le RVFV ainsi que sa circulation au sein des populations humaines ou animales (statut sérologique).

Lors d'une suspicion clinique, la recherche combinée d'anticorps de type IgM dirigés contre le RVFV (détectable de 7 jours à 3 mois post infection) par ELISA et de génome viral (détectable de 1 à 6 jours post infection) par RTqPCR est recommandée[213,215,381]. A ce jour, il existe très peu de moyens de lutte thérapeutique contre l'infection par le RVFV. Seulement certains vaccins sont commercialisés pour l'usage chez les ruminants tels que (i) les vaccins vivants atténués Smithburn, Clone 13 ou MP-12, ou (ii) des vaccins inactivés tel que le vaccin Formalin-inactivated Menya/Sheep/258 par exemple. Cependant, leurs potentiels effets tératogènes chez les femelles gestantes, une durée d'immunité variable en fonction des vaccins, ainsi que des stratégies de vaccination difficiles (disponibilité des vaccins, accessibilité des animaux) font que la vaccination est très hétérogène[219,391–396]. Il n'existe aucun vaccin commercialisé pour l'usage chez l'Homme ainsi qu'aucun traitement antiviral spécifique, rendant la prise en charge des cas de FVR uniquement symptomatique[214,295]. Cependant, certaines molécules ou vaccins semblent prometteurs pour l'usage chez l'Homme et continuent d'être explorés[394,397–400]. Par exemple, les vaccins hRVFV-4s et DDVax sont actuellement en essais cliniques chez l'Homme et semblent très prometteurs[401–404]. De plus, certains facteurs géographiques, gouvernementaux et socio-culturels peuvent retardés la déclaration, le

diagnostic et la prise en charge des foyers de FVR[307,405,406]. Etant donné le risque élevé d'émergence de la FVR, les recherches sur les mécanismes divers du RVFV ainsi que les stratégies de prévention représentent des facteurs clés dans la lutte contre les épidémies de FVR[4,114,234,407] :

1) **Protéger les animaux face à l'infection par le RVFV** : la mise en place de stratégies et politiques homogènes et cohérentes de vaccination des troupeaux de ruminants permet de limiter l'expansion du RVFV sur les différents territoires, les atteintes socio-économiques, ainsi que la transmission à l'Homme et le déclenchement d'épidémies[306]. De même, le contrôle strict du commerce et des mouvements d'animaux entre régions endémiques et non-endémiques est un moyen de prévention crucial.
2) **Définir, anticiper et protéger les zones et les populations à risque :** Etant donné le rôle majeur de la transmission vectorielle, la surveillance des populations de vecteurs et la modélisation des dynamiques d'expansion du RVFV (écologie des vecteurs et des hôtes) sont nécessaires pour définir et protéger les zones à risques en définissant des cartes de risque[232,408–413]. Etant donnée la diversité de vecteurs capables de transmettre le RVFV, la lutte antivectorielle n'est pas une stratégie de prévention raisonnablement envisageable. Cependant, des mesures protégeant les personnes travaillant avec des animaux (équipement de protection individuelle) ou limitant l'exposition aux vecteurs des habitants vivants à proximité des zones à risque limiteraient la transmission à l'Homme. Pour finir, la formation des professionnels et des populations à risque à la prévention, la reconnaissance et la prise en charge d'une épidémie ou épizootie de FVR semblent également être un facteur clé dans l'efficacité dans la prévention et prise en charge[414,415].
3) **Surveiller la circulation et le risque de transmission du RVFV** : la surveillance épidémiologique via le contrôle du statut sérologique et de la situation sanitaire de la faune domestique mais également de la faune sauvage permettrait d'anticiper le déclenchement d'épizootie. De même, définir les mécanismes de maintenance du RVFV dans l'environnement permettrait de limiter son émergence ou sa réémergence[350].
4) **Développer les connaissances sur la pathogénèse du RVFV :** de nombreuses questions en lien avec les mécanismes moléculaires associés à l'interaction RVFV-hôte restent en suspens, et notamment l'exploration des mécanismes en lien avec (i) la variabilité inter-individuelle et interspécifique de la pathologie, (ii) les facteurs viraux liés à la virulence de la souche, (iii) le rôle de la réponse immunitaire dans la résistance et dans la pathogénèse elle-même, (iv) les mécanismes impliqués dans le déclenchement des formes hémorragiques et (v) le tropisme multicellulaire du RVFV et les mécanismes de pathogénèse associés aux différents organes infectés. Explorer ces différents éléments permettrait de préciser et d'améliorer les stratégies thérapeutiques et de prévention contre les formes sévères de FVR.

Chapitre 4 : Infection du système nerveux par le RVFV

La neuropathogénèse induite par le RVFV a pu être explorée chez les modèles animaux, notamment les modèles murins et PNH, mais la neuropathogénèse chez l'Homme reste peu explorée[416]. De même, les formes neurologiques liées à l'infection par le RVFV chez les ruminants sont très peu décrites[363]. En effet, mis à part la description de certains cas d'atteintes neurologiques chez le veau ou le mouton suite à des infections expérimentales ainsi que la

description de signes cliniques de type neurologique chez les dromadaires infectés lors de l'épizootie de FVR en 2010 en Mauritanie, il est souvent décrit qu'aucun antigène viral ou lésions du SNC ne sont retrouvés chez les ruminants[304,330,337,417–419]. Seuls les jeunes animaux tels que les agneaux de moins de 1 mois et les fœtus ovins présentent des œdèmes cérébraux sans antigènes viraux dans le SNC. En effet, il semble que certains organes ne soient atteints que via leur compartiment sanguin et que leurs parenchymes ne soient pas infectés. Par exemple chez l'agneau et le fœtus ovin, on observe des virions dans le compartiment sanguin du système nerveux, mais on ne retrouve pas de particules virales associées directement à celui-ci ni de cellules infectées[331,420]. Ainsi, il semblerait que le déclenchement de formes neurologiques tardives soit espèce-dépendant. Ce chapitre 4 s'attache à décrire et à détailler les connaissances en lien avec les formes neurologiques de la FVR chez les modèles animaux et l'Homme.

I. La neurovirulence du RVFV chez les modèles animaux

i. La neurovirulence du RVFV chez le modèle murin

Caractérisés comme hautement susceptibles à l'infection par le RVFV, les modèles de rongeurs, et notamment de souris, ont permis d'explorer les formes neurologiques associées au RVFV en condition *in vivo*. Plusieurs espèces de rongeurs ont été utilisées pour explorer la neuropathogénèse du RVFV : les souris, les rats, le furet (*Mustela purotius furo*) ou encore la gerbille (*Meriones unguiculatus*)[349,353,416,421,422]. Néanmoins, dans cette sous- partie, la majorité des explorations et des connaissances en lien avec la neurovirulence du RVFV sont issues d'expérimentations sur le rat et la souris.

Tout d'abord, les rongeurs développent une forme neurologique tardive du RVFV se manifestant environ 1 semaine après infection, c'est à dire chez les survivantes en phase de convalescence avec une diminution de la virémie et des atteintes hépatiques[353,366,380]. Le déclenchement de cette forme neurologique conduit classiquement à 100% de mortalité des souris BALB/c, avec cependant une variabilité de la mortalité chez les rats ou les souris en fonction de leur fond génétique[353,380,416,423,424]. Les formes neurologiques tardives chez la souris se manifestent par une méningoencéphalite conduisant à des symptômes tels que des paralysies, des troubles moteurs, des hémorragies cérébrales tardives, et sont associés à une augmentation tardive des titres viraux dans le SNC comparé aux autres organes tels que le foie, la rate ou encore les reins (6 jours post-infection)[353,425]. De même, les modifications histologiques apparaissent tardivement avec la présence d'antigènes viraux dans l'ensemble du SNC, une nécrose neuronale parcellaire ou étendue, des lésions corticales, une agglomération périvasculaire de leucocytes ainsi qu'une infiltration importante dans le parenchyme cérébral de leucocytes proinflammatoires, tels que des lymphocytes, des macrophages et des neutrophiles[353,356,380,416].

Comme décrit précédemment, la voie d'inoculation des rongeurs influence la sévérité et la vitesse de déclenchement des méningoencéphalites : l'infection par voie intra-nasale ou par aérosols conduit à des encéphalites plus sévères et une réplication plus rapide du RVFV dans le SNC (2 jours post-infection)[358]. Cependant, l'infection par injection sous-cutanée ou intrapéritonéale conduit également au déclenchement de formes neurologiques, suggérant que le RVFV est capable d'utiliser plusieurs mécanismes de neuroinvasion[353,422,425,426]. Concernant

la voie non-hématogène, il a été récemment décrit que l'infection des rats par aérosols conduit à l'infection précoce de l'épithélium olfactif puis des neurones olfactifs, suggérant ainsi un mécanisme de neuroinvasion par transport axonale rétrograde médié par ces neurones à un stade précoce de l'infection[427]. Ce mécanisme reste encore à confirmer, mais semble cohérent étant donné que cette voie d'infection majore la sévérité des formes neurologiques[358]. De plus, d'autres auteurs ont montré la présence d'antigènes viraux dans les fibroblastes du perineurium de certains nerfs crâniaux[353]. Cependant, d'autres auteurs ont décrit que la quantité d'ARN viral reste stable et faible dans les nerfs périphériques, suggérant alors que le transport axonal rétrograde du RVFV à partir des axones périphériques est peu probable et très limité, mais cela reste à explorer. De ce fait, il est possible que ce mécanisme de neuroinvasion soit spécifique au nerf olfactif[361,380]. Concernant la voie hématogène, la neuroinvasion par infection directe n'a pas encore été démontrée. Certains auteurs suggèrent que les cellules endothéliales de la BHE ne sont pas infectées chez les rongeurs, mais ceux-ci déclarent également un défaut de coloration des échantillons leur empêchant de visualiser correctement la BHE et donc de conclure sur ce dernier point[131,353]. D'autres auteurs ont démontré que, suite à l'infection par aérosols de rongeurs, l'infection du SNC conduit tardivement (5 à 6 jours post-infection) à l'augmentation de la perméabilité de la BHE corrélée à une augmentation du titre viral dans le SNC. Ces résultats suggèrent ainsi une neuroinvasion par paracytose passive du RVFV dans les stades tardifs de l'infection, pouvant alors majorer les manifestations neurologiques[357,366,380]. Cependant, le déclenchement de formes neurologiques chez les souris infectées par voie sous-cutanée suggère que le RVFV est capable d'accéder directement au SNC par un mécanisme de neuroinvasion précoce de la voie hématogène et qui reste encore à définir.

Chez la souris, en phase tardive de l'infection, soit 6 jours post-infection, de nombreuses particules virales sont retrouvées dans l'ensemble du SNC (encéphale et moelle épinière). Certains auteurs ont d'ailleurs décrit que les atteintes du SNC sont plus sévères et précoces dans la moelle épinière et le tronc cérébral[366]. Ainsi, il a été décrit que les astrocytes, les microglies, et de multiples types de neurones sont massivement infectés à partir de 6 jours post-infection et présentent une altération de leur organelles cytoplasmiques (Figure 23)[353,361,366]. Concernant les neurones, les particules virales ont été retrouvées seulement dans le corps cellulaire mais dans aucun axone ou dendrite. De même, les auteurs ont observé que la production de particules virales semblait en grande partie médiée par les cellules gliales. Par ailleurs, à 6 jours post-infection, un œdème périvasculaire sans infiltration leucocytaire est observé, accompagné d'une dysfonction osmotique entrainant une altération nucléaire et mitochondriale des cellules adjacentes (neurones et cellules gliales). L'ensemble de ces dégâts se majore avec la poursuite de la production virale au cours du temps dans le SNC[353,366,380]. Les atteintes tissulaires dans le SNC murin sont dues à l'induction de mécanismes apoptotiques. En effet, il a été démontré que l'infection par le RVFV des neurones et cellules gliales, notamment les microglies et les astrocytes, induit un effet cytotoxique sur le tissu nerveux et conduit à la mort des cellules par apoptose. Cet effet cytotoxique serait d'origine viral, par infection directe des cellules, mais serait également d'origine immunitaire par l'activation des astrocytes et des microglies dans le SNC qui mettent en place une réponse inflammatoire (IL-6, TNFα, IL1β)[366,428,429]. Ces dégâts

se manifestent alors tardivement par des lésions du tissu nerveux, des hémorragies cérébrales et une infiltration leucocytaire dans le SNC après 8 jours post-infection[353,380].

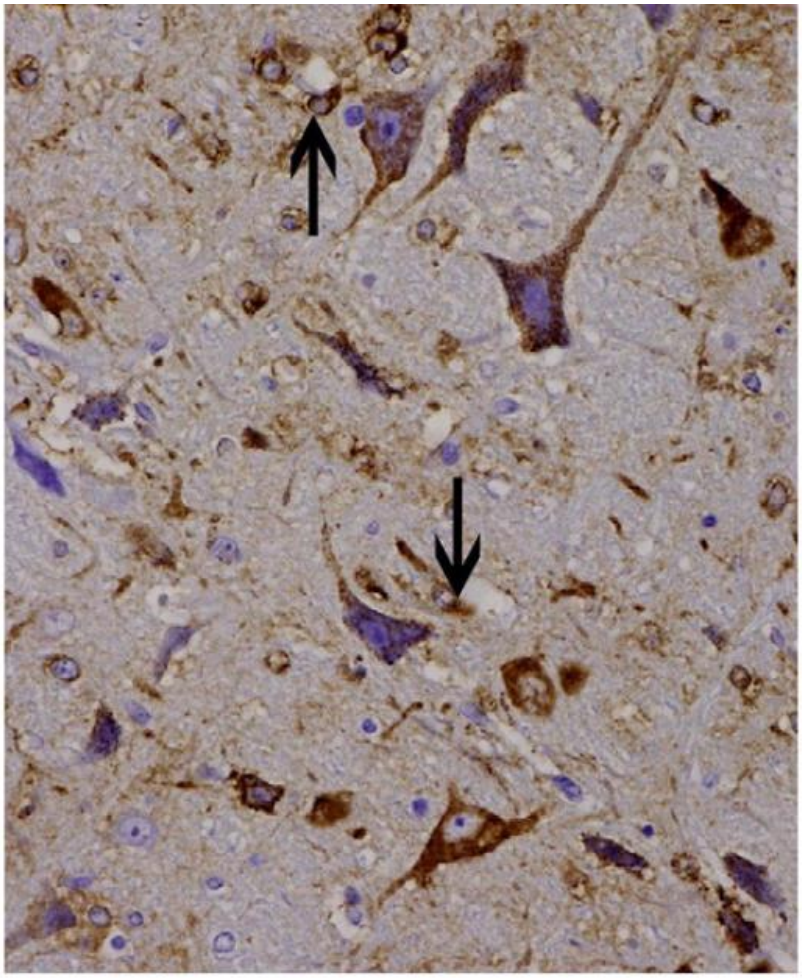


Figure 23 : Coupe de cerveau de souris infectée par le RVFV. Le marquage a été réalisé par coloration hématoxyline/éosine (HE) suivie d'un marquage immunohistochimique avec un anticorps primaire anti-RVFV et un anticorps secondaire marqué peroxydase (marron : RVFV, bleu : noyau, flèche noire : cellules gliales) (Adaptée de Smith et al, 2010)

Le rôle de la réponse immunitaire dans la majoration des dégâts tissulaires du SNC lors de l'infection par le RVFV est un point qui pose question chez les rongeurs. Chez les souris, il est décrit que la mise en place précoce de la réponse immunitaire naturelle, notamment la réponse IFN, suivie de la mise en place de la réponse adaptative avec la production de lymphocytes T $CD4^+$ auxiliaires et d'anticorps neutralisants, sont essentielles à la clairance du RVFV, à la survie de la souris et à la prévention des formes neurologiques[392,430–434]. La réponse IFN de type II a également été explorée mais ne semble pas participer à la protection des formes neurologiques chez le modèle murin[370,434]. De plus, la mise en place de la réponse immunitaire par les cellules neurales telles que les microglies est essentielle au contrôle de la réplication virale dans le SNC[435].

Cependant, la mise en place d'une réponse immunitaire, et notamment inflammatoire, conduit à une atteinte des compartiments périvasculaires et du parenchyme cérébral associée à un recrutement massif de leucocytes, un élément décrit comme majeur dans la neuroinflammation et pouvant participer à la pathogénèse du RVFV[359]. Tout d'abord, il a été montré que la mise en place d'une réponse immunitaire retardée, dérégulée et ineffective

limiterait alors le contrôle périphérique de l'infection, ce qui permettrait l'infection du SNC. Certains marqueurs inflammatoires sont ainsi retrouvés précocement dans les formes neurologiques avec une augmentation systémique de cytokines proinflammatoires et de marqueurs de l'activation endothéliale. De même, corrélée à la réplication du RVFV dans le SNC, on retrouve cette même augmentation des cytokines et chimiokines proinflammatoires conduisant à la mise en place d'une neuroinflammation. Chez le rat par exemple, il est décrit que les formes neurologiques sont associées à une augmentation systémique de cytokines proinflammatoires (CCL5, IL-1β, CCL2) puis une augmentation tardive de ces cytokines dans le SNC[380,436]. Associée à l'ensemble de ces éléments, une infiltration accrue de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles dans le SNC participerait également à majorer la neuroinflammation en activant les microglies et favorisant leurs sécrétions de cytokines proinflammatoires dans le SNC[356,429,433].

Pour conclure, la réponse immunitaire précoce joue un rôle primordial dans le contrôle du RVFV et dans la prévention des formes neurologiques. Toutefois, les formes neurologiques sont associées à un défaut de contrôle de la réplication virale par la mise en place retardée et dérégulée d'une réponse immunitaire naturelle périphérique, permettant ainsi la neuroinvasion par le RVFV. Après infection de nombreuses cellules dans l'ensemble du SNC, le RVFV induirait le développement de lésions cérébrales potentiellement majorées par une immunité dérégulée favorisant un contexte inflammatoire neurotoxique[429,433]. En effet, l'atteinte du SNC serait principalement d'origine virale : la déplétion des cellules immunitaires proinflammatoires ne protègent pas des formes neurologiques chez les modèles murins, suggérant que ces dégâts ne sont pas directement liés à cette infiltration leucocytaire, mais bien directement médiés par l'infection virale. Cependant, l'infection du SNC induit l'activation des cellules gliales qui pourraient potentiellement participer indirectement à la neuropathogénèse en exacerbant le contexte neuroinflammatoire dans les phases tardives de la pathologie, mais cela reste à explorer[356,429].

ii. La neurovirulence du RVFV chez les modèles primates non-humains

Un autre modèle utilisé sont les PNH, comme le macaque Rhésus (*Macaca mulatta*), le macaque crabier (*Macaca fascicularis*), le grivet (*Chlorocebus aethiops*) ou le ouistiti commun (*Callithrix jacchus*)[349,355,372,437]. Ces deux derniers modèles ont une susceptibilité importante, mais espèce dépendante, à l'infection par le RVFV et développent des symptômes proches de ceux retrouvés chez l'Homme : virémie, hyperthermie, leucopénie, nécrose hépatique, hémorragies et une encéphalite tardive fatale (8 à 11 jours post-infection)[355,437]. Tout comme le modèle murin, ces deux modèles PNH développent une encéphalite tardive que ce soit par injection intraveineuse, sous-cutanée ou encore par aérosols. Cependant, comme précédemment décrit, l'infection par aérosols majore la sévérité des atteintes neurologiques atteignant des taux de mortalité allant de 50 à 80% [355,416,437]. Ces caractéristiques font des PNH des modèles de choix pour étudier les formes neurologiques du RVFV.

Ainsi, chez le ouistiti commun, la forme neurologique se manifeste également par des lésions du parenchyme cérébral dans l'ensemble du SNC et est associée à une infiltration modérée de leucocytes dans le parenchyme cérébral (lymphocytes et neutrophiles). Ces lésions

sont caractérisées par une nécrose et dégénérescence des neurones, la présence accrue de cellules gliales autour des neurones, une activation et une prolifération des cellules gliales ainsi que la phagocytose des neurones nécrotiques ou dégénérés. Chez le grivet, la majorité des lésions du tissu nerveux est associé à l'encéphale, avec notamment la présence de neurones apoptotiques dans de nombreuses régions, une méningite et une vascularite d'origine lymphocytaire suite à l'infiltration de lymphocytes dans le SNC. De façon intéressante, les neurones apoptotiques ne sont pas ou peu associés à une inflammation du parenchyme, suggérant le rôle direct de l'infection des neurones par le RVFV dans la mort cellulaire. En effet, la présence de neurones infectés par le RVFV ainsi que des titres importants de RVFV dans l'encéphale et la moelle épinière ont également été confirmés chez ces deux modèles de PNH présentant des encéphalites (Figure 24)[355,437]. Cependant, aucun virus n'a été détecté dans le LCR des PNH infectés[355]. Tout comme chez le modèle murin, l'augmentation du titre de RVFV dans le SNC est corrélé à une forme neurologique fatale[372].

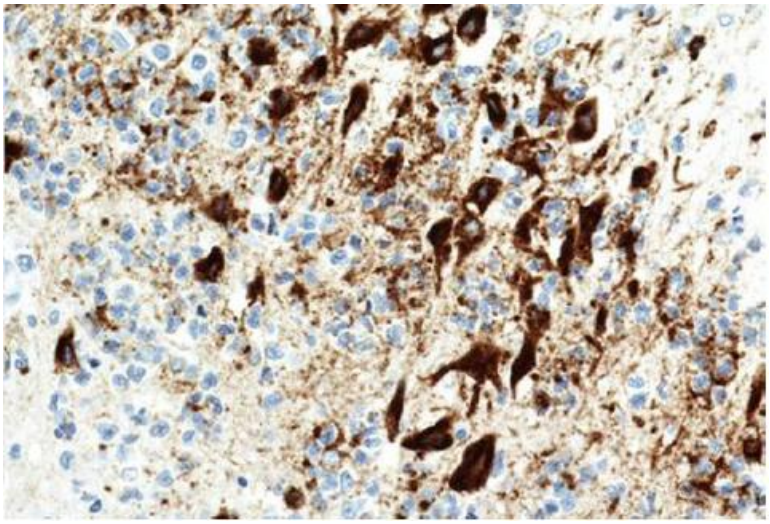


Figure 24 : Coupe d'encéphale de ouistiti commun présentant des neurones infectés par le RVFV (marquage immunohistochimique spécifique de RVFV, marron) (Adapté de Smith al., 2011)

Une fois de plus, la mise en place précoce de la réponse IFN de type I, mais également de type II, est associée à la survie des individus infectés[372,438]. En effet, une augmentation précoce des cytokines et chimiokines proinflammatoires (IL-6, IL-8), ainsi que la mise en place de la réponse adaptative, sont corrélées à une augmentation du taux de survie alors qu'un retard dans la mise en place de cette réponse est corrélé à un taux de mortalité plus important[372]. De plus, la présence d'anticorps anti-RVFV et l'absence de virus dans le SNC sont des caractéristiques communes des survivants pour les deux espèces[355]. Ainsi, les modèles de PNH confirment le rôle protecteur de la réponse immunitaire précoce : un retard de cette dernière ne permet pas de contrôler l'infection du SNC ce qui engendre une encéphalite fatale. Ces conclusions sont également en faveur d'une origine virale et non pas immunitaire dans la neuropathogénèse du RVFV.

iii. La réponse immunitaire et la neurovirulence du RVFV influencées par NSs

Brièvement décrit dans les parties précédentes, le facteur de virulence NSs, codé par le segment S, est le facteur de virulence primordial du RVFV. En effet, NSs joue de nombreux rôles afin de faciliter le cycle de réplication et de multiplication du RVFV, et notamment en interférant avec de nombreuses voies cellulaires impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire. Tout d'abord, il a été décrit que l'ARN simple brin du RVFV conduit à la mise en place de la réponse IFN de type I (IFNα et IFNβ) par l'activation du PRR cytoplasmique RLR qui conduit à l'activation du régulateur MAVS et des facteurs de transcription IRF[439] (Figure 25).

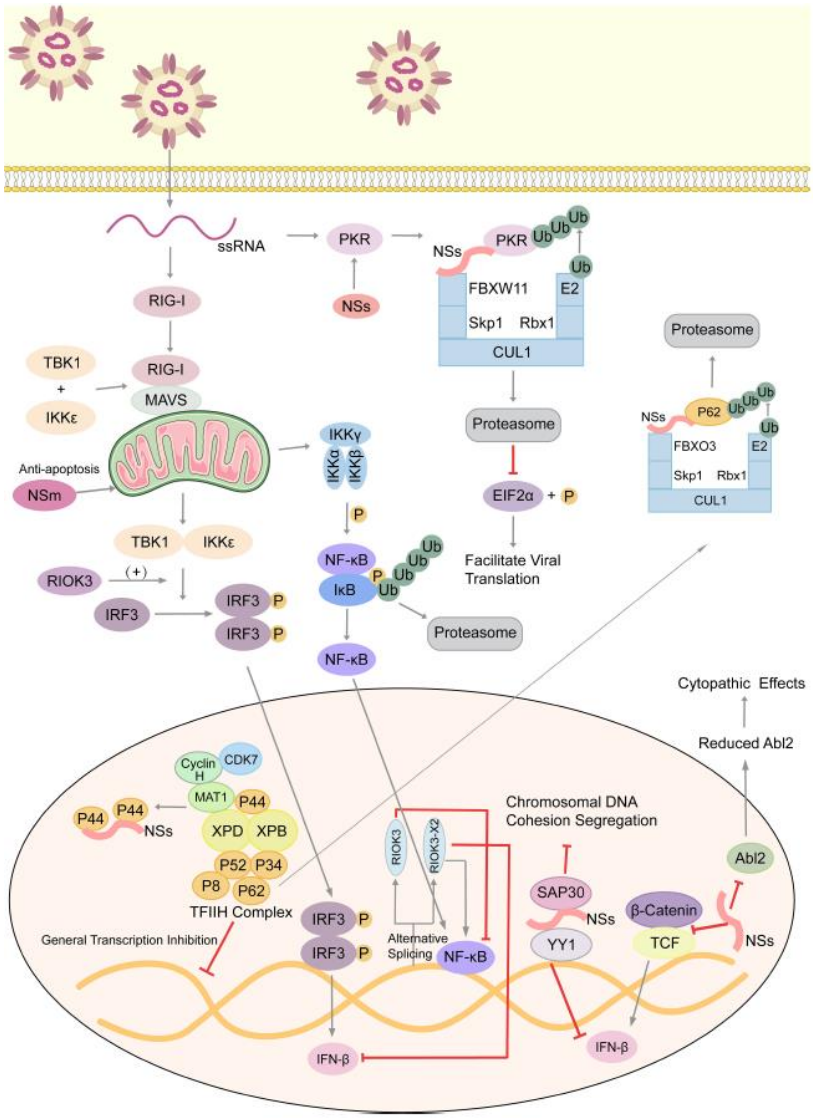


Figure 25 : Rôles et interférences du facteur de virulence NSs de RVFV sur les différentes voies et fonctions cellulaires (Wang et al., 2023)

Il a d'ailleurs été démontré que cette activation de MAVS par les microglies est nécessaire à la survie et à la résistance des souris aux formes neurologiques de RVFV[430]. De même, il est également démontré que la reconnaissance du RVFV pouvait être médiée par certains TLR et leurs composants, conduisant à l'activation d'autres voies immunitaires et à la mise en place d'autres stratégies de lutte antivirale telles que l'activation de l'autophagie[440,441].

La mise en place de la réponse IFN de type I va permettre la production d'ISG qui vont inhiber la réplication du RVFV dans les cellules activées tels que ISG15, OASL2 ou encore les protéines Mx[369,370,442]. Le rôle des exosomes cellulaires dans la communication intercellulaire pour majorer la mise en place de la réponse IFN a également été décrit, mais reste à ce jour très peu exploré et débattu[443]. En effet, il a également été décrit que ces exosomes pourraient également favoriser la neuropathogénèse virale en majorant la transmission intercellulaire de matériels génétiques viraux ou en facilitant le passage à travers la BHE[444].

Le RVFV a développé un facteur de virulence afin d'échapper à ces défenses immunitaires mises en place par les cellules infectées. Ce facteur de virulence est la protéine virale de petite taille NSs (30kDa) uniquement exprimée et traduite dans le cytoplasme des cellules infectées. Le rôle de cette protéine virale dans le cycle de réplication est si important qu'une stratégie d'assemblage particulière a été décrite afin de synthétiser cette dernière au plus tôt dans l'infection de la cellule. En effet, malgré que l'assemblage soit décrit comme un mécanisme non-sélectif pour le RVFV, certains auteurs ont démontré que l'assemblage favoriserait l'inclusion dans la particule virale du brin antigénomique du segment S, donc codant directement pour la protéine NSs[277,445,446]. Après sa traduction, NSs va s'agréger par incorporation continue de monomères et migrer vers le noyau cellulaire où elle va continuer de s'agréger pour former une grande structure filamenteuse sous forme de fibrilles de type amyloïdes[447,448]. Ainsi, au cours de l'infection d'une cellule, des agrégats globulaires de NSs sont retrouvés dans son cytoplasme et des larges filaments de NSs sont retrouvés dans le noyau. Ces deux structures de NSs participent à la virulence de RVFV[447,448]. De ce fait, NSs va pouvoir interférer avec différentes fonctions et voies cellulaires (Figure 25) :

1) <u>Inhibition de la réponse IFN :</u> NSs va inhiber la transcription des gènes codant pour la production d'IFN en séquestrant le complexe répresseur SAP30 sur le promoteur des gènes conduisant à la production de l'IFNβ[280,449].
2) <u>Inhibition de la réponse cellulaire intrinsèque :</u> NSs va conduire à la dégradation de PKR, un facteur cellulaire activé par la reconnaissance des ARN double brin et qui active une cascade conduisant à l'inhibition totale de la traduction cellulaire dans le but d'inhiber la production des protéines virales[450]. Ainsi, NSs lutte contre cette défense antivirale afin de maintenir la traduction des ARN viraux. De plus, une étude récente a également décrit que NSs pouvait interagir avec certains acteurs de l'autophagie dans le but de l'inhiber[451].
3) <u>Inhibition de la transcription cellulaire :</u> Il a été démontré que NSs est capable d'interagir avec des séquences régulatrices et des promoteurs de nombreux gènes de la cellule hôte, incluant des gènes de la réponse immunitaire, et conduit donc à l'inhibition de leur expression[449]. De plus, NSs va interférer avec l'assemblage du facteur de transcription TFIIH, inhibant ainsi la transcription cellulaire générale et la mise en place de la réponse immunitaire également[452–454]. De même, il a également été montré que NSs pourrait inhiber l'export nucléaire des ARNm cellulaires et donc leur traduction, mais ce mécanisme est très peu décrit[455].
4) <u>Arrêt du cycle cellulaire :</u> La présence des filaments de NSs dans le noyau induit des dommages sur l'ADN, et ces dommages vont conduire à l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt favoriserait la réplication du RVFV, mais ce mécanisme est peu décrit[456,457].

5) Altération de la morphologie et de la mobilité cellulaire : NSs va également altérer l'expression de Abl2, un régulateur majeur du cytosquelette d'actine, ce qui va affecter la morphologie, la mobilité et les interactions cellules-cellules des cellules infectées[458].

NSs est par conséquent un facteur de virulence majeur du RVFV avec un rôle direct et indirect dans la neurovirulence. En effet, l'absence de NSs ne permet pas la dissémination du RVFV jusqu'au SNC chez la souris, probablement dû à la mise en place de la réponse immunitaire périphérique de l'hôte dans les étapes précoces de l'infection[352,459]. Cependant, il semble que NSs participe à la neuroinvasion de façon indirecte : une souche délétée de NSs est capable d'atteindre le SNC suite à l'infection par aérosols, suggérant que le potentiel transport axonal rétrograde médié par les neurones olfactifs est indépendant de NSs[460]. De plus, il a été montré qu'en l'absence de NSs, à faible dose et suite à une injection directe par voie intra-crânial, la réplication du RVFV est limitée et la neuropathogénèse chez les souris n'est plus observée. Associé à la formation de dépôts amyloïdes dans le SNC décrit comme pouvant être directement neurotoxiques, il semblerait que NSs joue un rôle majeur dans la neurovirulence de RVFV en permettant indirectement son accès au SNC puis en majorant sa réplication et persistance dans ce dernier[447,448,460].

II. La neurovirulence du RVFV chez l'Homme

La neurovirulence du RVFV associée aux formes neurologiques humaines reste à ce jour encore très peu caractérisée. En effet, depuis la description des premiers cas humains de FVR, l'exploration de la physiopathologie du SNC humain associée à l'infection du RVFV est décrite dans de très rares études. La plus ancienne de ces études date de 1977 et décrit 17 cas humains de FVR suite à la manipulation de carcasses animales infectées, ou vivant à proximité des animaux infectés, durant l'épizootie ayant sévi en 1975 en Afrique du Sud. Cette étude reste encore à ce jour la référence de la physiopathologie du SNC suite à l'infection par le RVFV, ce qui image parfaitement le peu de connaissances et de recherches sur cet aspect précis de la FVR chez l'Homme. Dans cette étude, les auteurs ont analysé les manifestations histopathologiques de la FVR chez 12 patients atteints d'une méningite tardive, c'est-à-dire de 3 à 6 jours après la phase aigüe de la pathologie (hépatite, fièvre, hémorragies, syndrome grippal), se manifestant par un tableau clinique très large (stupeur, coma, hypersalivation, hallucinations visuelles, paralysie) avec 2 patients ayant succombé de cette forme sévère de la FVR (soit 17% des patients de l'étude). Ils ont pu mettre en avant que cette forme neurologique retardée était associée à une pleiocytose du LCR, c'est-à-dire à la présence de leucocytes en très grand nombre dans le LCR, et notamment des lymphocytes. De plus, par biopsie d'une personne décédée de cette forme neurologique, ils ont également pu mettre en avant la présence d'une infiltration de leucocytes, et notamment des lymphocytes, dans les zones périvasculaires de la neurovascularisation ainsi que dans le parenchyme cérébral associé à des foyers de nécrose (Figure 26). Dans les autres cas, l'atteinte neurologique n'était visible que par une accumulation des leucocytes dans l'espace périvasculaire. Ces patients sont potentiellement décédés plus précocement suite aux hémorragies associées à l'infection, limitant alors le développement des atteintes neurologiques. Pour finir, l'ensemble des personnes survivantes à l'infection ont développées des anticorps neutralisants anti-RVFV[461].

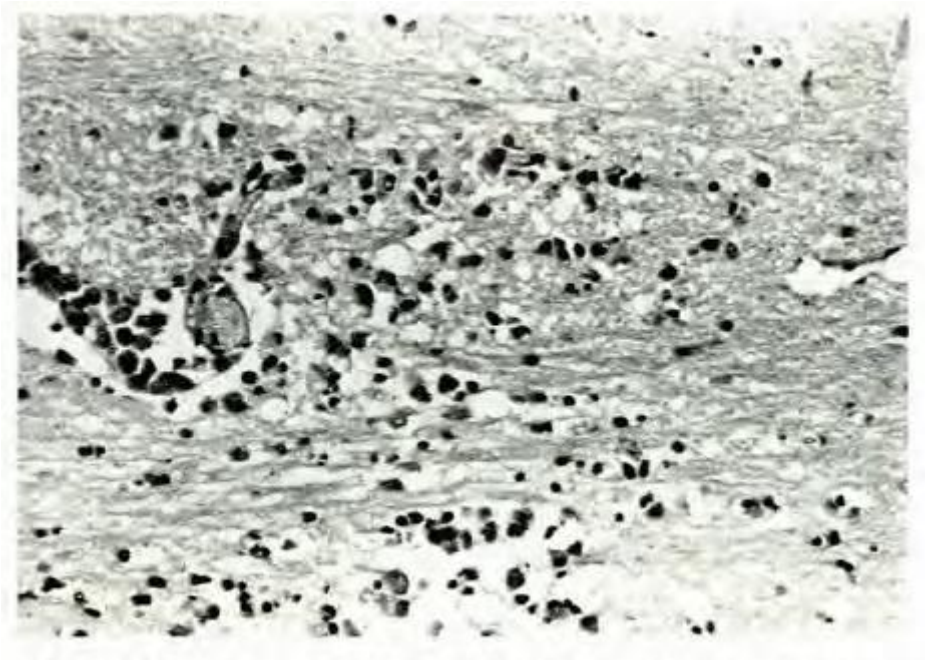


Figure 26 : Foyer de nécrose du parenchyme cérébral associé à une infiltration leucocytaire dans une biopsie cérébrale d'un patient décédé suite à une infection par le RVFV (Van Velden et al., 1977)

Depuis, des données issues des épidémies de FVR d'Egypte en 1977 et en Arabie Saoudite en 2000 ont développé ces conclusions. Tout d'abord, une variabilité importante de la prévalence des formes neurologiques se retrouve en fonction des différentes épidémies, variant de 1 à 89% chez les cas symptomatiques et hospitalisés[123,214,337–339,462]. De même, la variabilité du taux de mortalité associé aux formes neurologiques de la FVR est très variable et peut atteindre des taux allant jusqu'à 57%[252,338]. Cependant, la présence générale de formes neurologiques dans les épidémies liées au RVFV est régulière et leur déclenchement chez un individu est souvent associé à un taux de mortalité plus élevé[123,339]. Malgré que les hommes représentent toujours une proportion plus importante que les femmes dans les cas de FVR dans les différentes épidémies, ceci étant notamment lié à la profession, il n'y a pas d'influence du sexe sur la sévérité des formes graves de la FVR[338,339]. De même, il semblerait que l'âge n'influence pas ou très peu la sévérité de l'infection ainsi que la prévalence des formes neurologiques[338,339,463,464]. Ces formes neurologiques sont toujours tardives : elles se manifestent très rarement dans la 1ère semaine après la période d'incubation mais davantage durant la phase de convalescence suivant la phase aiguë de l'infection (hyperthermie, atteinte hépatique, syndrome grippal, *etc.*). Ainsi, ces formes neurologiques se manifestent dans les 4 premières semaines après la phase d'incubation, parfois même jusqu'à 8 semaines après. Deux types de formes neurologiques tardives ont été décrites : une forme aiguë, conduisant rapidement au décès de la personne infectée, et une forme subaiguë d'évolution plus lente et dont le pronostic est plus favorable mais associé à de potentielles séquelles neurologiques définitives telles que des paralysies[214,338,343,416,463–467].

L'exploration de la physiopathologie humaine associée aux formes neurologiques durant ces épidémies a permis de confirmer les résultats précédemment observés. Une pleiocytose du LCR est toujours retrouvée dans les formes neurologiques et est un signe caractéristique d'une méningo-encéphalite. On retrouve notamment une proportion importante

de lymphocytes dans le LCR, mais également des neutrophiles et des macrophages. Cependant, cette pleiocytose est la seule perturbation physiologique du LCR observée : il n' y a pas de modification de la concentration en protéines ou en glucose[462–466]. Certains auteurs ont également décrit dans le LCR de patients infectés manifestant une encéphalite à RVFV la présence d'IgM anti-RVFV, la présence d'ARN viral ou encore isolé le RVFV[382,468–470]. Ces formes neurologiques se manifestent donc par une méningite et/ou une encéphalite et sont peu symptomatiques dans leur première phase. Cependant, les symptômes vont s'aggraver au cours du temps avec une modification de l'imagerie cérébrale : apparition sur l'encéphale de zones d'inflammations, de lésions, d'atrophies, d'œdème, d'une congestion de la matière blanche, et enfin d'une dégénérescence neuronale associée à une activation et une prolifération des microglies[123,338,466,469]. En effet, tout comme décrit en 1977, une accumulation de leucocytes dans les zones périvasculaires de la neurovascularisation ainsi que l'infiltration de leucocytes dans le SNC (lymphocytes, macrophages, neutrophiles) associée à des foyers de nécroses du tissu nerveux sont décrites dans les formes neurologiques de la FVR[123,131,469]. De même, une inflammation de la neurovascularisation est envisagée dans ces formes neurologiques, et notamment par la description d'une augmentation significative des marqueurs d'activation endothéliale tels que ICAM dans le sang de patients décédés suite à la FVR[342,466]. Cependant, mise à part la description d'un seul cas d'hémorragie cérébrale chez un patient atteint de multiples hémorragies suite à l'infection par le RVFV, les formes neurologiques de la FVR ne sont pas ou très peu associées à des hémorragies cérébrales[214,465,466]. Pour finir, les patients qui ont survécu aux formes sévères de la FVR ont toujours développé des anticorps contre le RVFV[463,464].

Objectifs, hypothèses et approches

Comme énoncé dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, le RVFV est un arbovirus dont les capacités de dissémination en font une préoccupation sanitaire majeure. Capable de générer des épidémies humaines, l'infection par le RVFV peut se manifester par des formes neurologiques sévères et potentiellement mortelles. Cependant, les mécanismes d'interactions entre le RVFV et le SNC humain sont très peu caractérisés. Les modèles animaux ont permis d'envisager certaines pistes de réflexion sur ces mécanismes, mais celles-ci ont été très peu explorées chez l'Homme. Le but de ce travail de thèse est donc d'explorer la neurovirulence du RVFV conduisant à des formes neurologiques humaines.

Malgré les nombreuses épidémies passées, la capacité du RVFV à infecter le SNC humain n'a pas été définitivement confirmée[123]. Les modèles animaux ont permis d'établir que de nombreux types cellulaires du SNC sont permissifs à l'infection par le RVFV, que ce soit les neurones ou les cellules gliales, tout en conduisant à la mort cellulaire par le déclenchement probable de mécanismes apoptotiques. De même, certains auteurs ont fait l'hypothèse que les cellules gliales du SNC participaient majoritairement à la réplication du RVFV, et donc à sa neuropathogénèse étant donné que l'augmentation de la charge virale est corrélée positivement à la virulence du RVFV[362]. Afin de conclure sur le neurotropisme humain du RVFV ainsi que de la participation des cellules gliales à son cycle de réplication dans le SNC, la première partie de ce travail de thèse a pour but de confirmer le neurotropisme humain du RVFV par infection des cellules gliales majoritaires du SNC : les astrocytes. Les astrocytes jouent de nombreux rôles de support pour l'homéostasie du SNC et sont d'ailleurs définis comme une cible clé dans la neuropathogénèse des virus neurotropes[471]. Les interactions entre le RVFV et les cellules gliales humaines ont été explorées par plusieurs approches *in vitro* en utilisant des astrocytes humains primaires. La participation des astrocytes humains au cycle de réplication du RVFV a été explorée par des approches de quantification virale classique (RTqPCR, titrage TCID50), et de microscopie à épifluorescence. L'impact de l'infection par le RVFV sur les astrocytes, peu maitrisé même chez les modèles animaux, a été exploré par des approches de microscopie à épifluorescence et de quantification de marqueurs spécifiques de l'apoptose par cytométrie en flux. Ces approches ont pour but de confirmer *in vitro* le neurotropisme humain du RVFV et de définir si la neuropathogénèse du RVFV peut être directement d'origine virale : augmentation du titre viral et induction de la mort de cellules neurales essentielles pour le bon fonctionnement du SNC.

Après avoir confirmé que le RVFV était capable d'infecter certaines cellules neurales du SNC humain, les mécanismes permettant au RVFV d'accéder au SNC ont été explorés[295]. De ce fait, la deuxième partie de ce travail de thèse se concentrera sur l'étude de la neuroinvasion humaine du RVFV par un mécanisme de la voie hématogène. La capacité du RVFV a infecté les cellules endothéliales de différents tissus a été confirmée par certaines études, mais la permissivité des cellules endothéliales de la BHE reste encore incertaine[330,353]. Ainsi, la neuroinvasion du RVFV chez l'Homme par le mécanisme d'infection directe des cellules endothéliales de la BHE et l'impact de cette infection sur l'intégrité de cette barrière essentielle ont été étudiées. Pour cela, la permissivité à l'infection par le RVFV des cellules endothéliales de la BHE a été explorée à l'aide d'un modèle *in vitro* de BHE humaine dont les

caractéristiques de sélectivité et de polarité sont similaires à celle de la BHE *in vivo*[472–476]. A l'aide de ce modèle, la permissivité de la BHE humaine à l'infection par le RVFV (les cellules endothéliales au pôle apical et les péricytes au pôle basal), ainsi que la capacité du RVFV à traverser cette barrière ont pu être explorées par infection expérimentale des différents types cellulaires et par quantification virale à l'aide de méthodes de titrage classiques. Aussi, par des méthodes de diffusion passive, de quantification indirecte de la mortalité cellulaire ou de microscopie confocale, l'intégrité de la BHE suite à son infection par le RVFV a pu être étudiée. L'ensemble de ces approches ont ainsi pour but d'explorer les mécanismes d'interactions possibles entre le RVFV et la BHE humaine afin de compléter les connaissances actuelles en établissant des pistes de réflexion cohérentes sur la compréhension de la neuroinvasion du RVFV lui permettant d'atteindre le SNC humain.

Enfin, le rôle de la réponse immunitaire dans la neuropathogénèse du RVFV reste toujours une question en suspens. En effet, la réponse immunitaire naturelle et précoce est essentielle à la résistance et à la prévention des formes neurologiques de la FVR, mais sa dérégulation ou son retardement serait potentiellement associé à une atteinte tissulaire plus importante et donc une sévérité accrue de l'infection. Ainsi, la réponse immunitaire pourrait-elle participer indirectement à la neuropathogénèse du RVFV chez l'Homme ? Afin de répondre à cette question, l'exploration de la réponse immunitaire a été réalisée suite à l'infection des astrocytes d'une part et de la BHE d'autre part. Pour ce faire, l'expression de nombreux gènes de la réponse immunitaire suite aux différentes infections a été quantifiée par RTqPCR, et la sécrétion des protéines immunitaires associées a été quantifiée par cytométrie en flux. L'exploration de cette réponse immunitaire par ces différents types cellulaires a pour but d'établir le rôle de celle-ci dans la résistance à l'infection (contrôle de la réplication du RVFV) ou dans la potentielle exacerbation de ces effets délétères (recrutement des cellules immunitaires, effet by-stander délétère de l'inflammation). En lien avec cette réponse immunitaire, le rôle du facteur de NSs dans la neurovirulence du RVFV a également été exploré. Pour ce faire, une souche naturellement délétée en NSs a été utilisée afin de définir le rôle de ce facteur de virulence dans les différentes approches citées précédemment par comparaison avec d'autres souches virulentes. Deux souches de RVFV issues du terrain et d'origines différentes (hôtes et localisations géographiques) ont été utilisées dans l'ensemble des approches afin de définir un potentiel facteur souche dans la neurovirulence du RVFV.

Partie 2 : Etude de la neurovirulence du RVFV chez l'Homme

Chapitre 1 : Neurotropisme et neuroinflammation du RVFV

I. Exploration *in vitro* des interactions entre RVFV et astrocytes humains

A ce jour, le neurotropisme humain du RVFV a été très peu caractérisé, il paraît donc important d'explorer cet aspect crucial de l'infection du RVFV, et notamment la capacité *in vitro* du RVFV à infecter des cellules neurales humaines. Il est décrit chez le modèle rongeur que le RVFV est capable d'infecter différents types cellulaires du SNC, et notamment des cellules gliales qui participeraient davantage à la réplication du RVFV, telles que les astrocytes. Etant donné le rôle central des astrocytes dans le maintien de l'homéostasie du SNC, la régulation de la réponse immunitaire du SNC et le bon fonctionnement de l'activité neuronale, les astrocytes sont décrits comme une cible clé dans la neuropathogénèse des virus neurotropes[46,471]. Ce chapitre a pour but d'explorer plus précisément les mécanismes d'interactions entre le RVFV et ce type cellulaire potentiellement permissif à son infection. Dans le but d'étudier la neuropathogénèse du RVFV, il a été décidé de déterminer le neurotropisme du RVFV et la neuroinflammation suite à son infection via des approches *in vitro* à partir d'astrocytes primaires d'origine humaine. Afin d'explorer si la mort cellulaire observée dans le tissu nerveux de patients présentant des formes neurologiques de FVR peut être directement d'origine virale, la viabilité des astrocytes suite à l'infection par le RVFV a également été exploré.

Les résultats de cette étude mettent en évidence que les astrocytes humains sont permissifs à l'infection du RVFV avec une augmentation du titre viral au cours du temps de façon souche-dépendante. Ces résultats confirment le neurotropisme *in vitro* du RVFV, cependant le récepteur impliqué dans cette interaction n'a pas pu être défini. Par ailleurs, les astrocytes infectés par le RVFV induisent la mise en place de l'apoptose, potentiellement retardée par une séquestration nucléaire des caspases-3 activées par la protéine NSs. L'infection des astrocytes conduit également à la mise en place d'une réponse IFN de type I et d'une réponse inflammatoire capable d'inhiber la réplication du RVFV. De plus, la réponse immunitaire induite par les astrocytes est inhibée. En effet, les souches virulentes inhibent de façon souche-dépendante et post-transcriptionnelle l'expression de la réponse immunitaire par une séquestration nucléaire des ARNm cellulaires, un mécanisme probablement médié par NSs. De plus, la cinétique de réplication des souches utilisées semble corrélée au degré d'inhibition de la réponse immunitaire, confirmant alors que cette activité de NSs est un élément majeur dans la neurovirulence du RVFV. Ainsi, étant donné que la pathogénèse du RVFV est directement corrélée à la charge virale, que l'infection des astrocytes conduit à leurs apoptoses, et que leur réponse immunitaire est fortement inhibée, les résultats de ce travail sont en faveur d'une origine virale des atteintes cellulaires précoces observées dans le SNC humain. Ces résultats ont été valorisés par une publication dans le journal *Emerging Microbes & Infections* présentée dans la section suivante (Article 1, données supplémentaires en Annexe 3) et présentés à différents congrès scientifiques (Annexe 4).

II. Article 1: Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes

Emerging Microbes & Infections
2023, VOL. 12, e2207672 (15 pages)
https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2207672

EMI Taylor & Francis Taylor & Francis Group

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS Check for updates

Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes

Jordan Quellec[a,b], Aurélie Pédarrieu[b], Camille Piro-Mégy[b], Jonathan Barthelemy[a], Yannick Simonin[a,b], Sara Salinas[a]* and Catherine Cêtre-Sossah[b]*

[a]Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France; [b]ASTRE, University of Montpellier, CIRAD, INRAe, Montpellier, France

ABSTRACT

Rift Valley fever (RVF) is an arboviral disease of zoonotic origin that causes recurrent epidemics in Africa, the Arabic Peninsula, and islands of the South West of the Indian Ocean. RVF occurs mainly in livestock but also affects humans with severe clinical manifestations, including neurological disorders. However, human neuropathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) is still poorly characterized. To study the interactions between RVFV and the central nervous system (CNS), we focused on RVFV infection of astrocytes, the major glial cells of the CNS that have several supporting roles including immune response regulation. We confirmed the permissiveness of astrocytes to RVFV infection and highlighted a strain-dependent infectivity. We showed that RVFV infection of astrocytes induced cell apoptosis and observed that the RVFV Non-Structural protein NSs, a known virulence factor, potentially delayed apoptosis by sequestrating activated-caspase 3 in the nucleus. Our study also showed that RVFV-infected astrocytes upregulated expression of genes associated with inflammatory and type I interferon responses at the mRNA level, but not at the protein level. This inhibition of immune response is potentially due to a NSs-dependent mechanism of mRNA nuclear export inhibition. Together, these results highlighted the direct impact of RVFV infection on the human CNS through the induction of apoptosis and a possible inhibition of early-onset immune responses that are crucial for the host survival.

ARTICLE HISTORY Received 12 January 2023; Revised 16 April 2023; Accepted 22 April 2023

KEYWORDS Rift Valley fever virus; arbovirus; astrocytes; apoptosis; immune response; interferon; neurovirulence

Introduction

Several emerging diseases are caused by viruses of zoonotic origin, including arthropod-borne viruses (arboviruses), and represent a major public health threat for humans [1]. Increased human activities, global warming, and environmental changes are involved in pathogen emergence: in this context, it is crucial to better understand, treat, and prevent the arrival of vector-borne viral diseases by improving our knowledge on arbovirus–host interactions [1,2]. Furthermore, some arboviruses such as Japanese encephalitis virus (JEV) or West Nile virus (WNV) cause epidemics involving a large burden of neurologic disorders [3]. Rift Valley fever (RVF), described in 1930 in Kenya [4] and caused by the RVF virus (RVFV), a negative single-stranded RNA virus from *Phlebovirus* genus, is one of these arboviruses of greatest concern for human and animal health [5]. RVFV is still responsible for alarming, re-occurring, and ongoing epidemics in endemic countries in Africa, the South West of the Indian ocean region, and the Arabian peninsula [6]. The lack of specific antiviral and preventive treatment including human vaccine, the poorly characterized pathogenesis mechanisms, and the increased risk of emergence place RVF on the World Health Organization list of "Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts."

RVFV has a complex biological cycle divided in a maintenance cycle in wildlife that allows RVFV persistence in the environment up to a decade and a complex transmission cycle from vector populations (e.g. *Aedes and Culex sp.*) to livestock (sheep, goats, cattle and camels), causing high mortality in young animals and high number of abortions [7]. However, the main transmission route for human infection is from direct contact with aerosolized particles from infected animal tissues and fluids [7]. Transmission by mosquito bite to humans is still discussed and inter-human

CONTACT Sara Salinas sara.salinas@inserm.fr Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, Etablissement Français du Sang, Montpellier 34394, France; Catherine Cêtre-Sossah catherine.cetre-sossah@cirad.fr ASTRE, University of Montpellier, CIRAD, INRAe, Montpellier 34398, France
*These authors contributed equally to this study.
Supplemental data for this article can be accessed online at https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2207672.
© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

horizontal transmission is undescribed at this time [7,8].

Given the inter-individual and inter-epidemic variability in terms of severity of RVFV infection, human mortality rate varies from 0.5% to 2% but can reach higher rates (e.g. 28.2% in Tanzania in 2007) [7,9–11]. Severe clinical signs are described: acute hepatitis, haemorrhagic fever, ocular diseases, and neurologic disorders [9,10]. The prevalence of neurologic disorders varies, depending on the studies and epidemics, but represent approximatively <1% to 21% of symptomatic cases [9,12]. These neurological forms are characterized by an acute or delayed meningoencephalitis occurring one to four weeks post-infection leading up to 50% of mortality and potential definitive disorder like incontinence or hemiparesis [9,10]. Associated with severe neurological symptoms (e.g. convulsion, hallucination, or coma), brain damages are characterized by tissues necrosis with lymphocytes and macrophages infiltration, lymphocytic pleocytosis, and perivascular cuffing [9,10,13].

Given that RVFV infection of rodents, non-human primates (NHP), and humans induces neurological disorders, it seems that RVFV can reach the brain [9,14–16]. Nowadays, RVFV neurotropism and neurovirulence are demonstrated in the rodent model with an active replication of RVFV in the central nervous system (CNS) cells [15,17–19], and with an early induced immune response associated with host survival, notably type I interferon (IFN) [20]. Moreover, CNS infection also induces a late immune response associated with infiltration of immune cells (macrophages, neutrophils, and lymphocytes), required for viral clearance but possibly leading to brain tissue damage [21–25]. However, RVFV neuroinvasion, neurotropism, and neuropathogenesis mechanisms in the human CNS are still poorly characterized [16,26,27]. Precisely, the potential origin of neurological disorders is not elucidated and could be due either to the establishment of a dysregulated immune response detrimental to the CNS homeostasis, or direct viral-induced cell lysis, or, most probably, to both mechanisms.

In the CNS, glial cells display numerous supportive functions for neuronal activity and survival. Astrocytes, one of these glial cells, are the most numerous cells in the brain and play a role in CNS physiological and metabolism regulation (neurotransmitters level, cerebral blood flow, energy metabolism, etc.) including immune responses [28]. In order to characterize neuroinfection mechanisms of RVFV in humans, we studied the interactions between astrocytes and RVFV through an *in vitro* approach assessing the permissiveness of astrocytes, cell viability, and associated-immune responses using different RVFV strains. Role of RVFV Non-Structural protein NSs, a major virulence factor forming nuclear filament and implicated in host immune response inhibition, was also explored [29].

Materials and methods

Viral stocks and quantification

Independent stocks of two RVFV strains isolated from the field, the strain MRU25010-30 (Passage 1, Mauritania, 2010, KM210508) [30], and the strain Mayotte 2008/00099 (Passage 1, Mayotte, 2008, HE687302-HE687304) [31], as well as the naturally NSs-delated strain Clone 13 (Passage 3, Bangui) [32], a kind gift from M. Bouloy (Institut Pasteur, Paris), were produced using African green monkey kidney Vero cells. Virus-containing medium was harvested when the cytopathic effect exceeded 75% and used as virus stock. For each virus stock and each experiment, viral infectivity titre from supernatant was determined by limiting dilution on Vero cells (TCID50, Tissues Culture Infectious Dose 50%) and calculated with Spearman–Kärber method [33].

Cell culture and viral infections

The African green monkey kidney Vero cells were grown at 37°C-5% CO_2 in MEM medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Minimal Essential Medium, Gibco, USA) and 10% decomplemented foetal bovine serum (FBS) (Corning, France). Human primary astrocytes (ScienCell™, HA, 1800, lot 25672, USA), were maintained on flask or plate coated with Poly-D-Lysine 0.01% (Gibco, France) according to manufacturer's instructions and used for RVFV infection (Passage 2–6). Astrocytes were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 in a 6-well ($1.8–3 \times 10^5$ cells per well) or 12-well format (10^5 cells per well) plates. Inocula prepared by diluting virus from viral stock in the appropriate culture medium were added during 90 min. A mock control corresponding to the inoculum with medium only was included for each infection. At indicated time point post-infection, supernatants and cells were harvested and stored at −80°C.

Indirect immunofluorescence assays

To test human astrocytes infectivity, monolayers of astrocytes were infected during 48 h on 12-well plates containing coverslips coated with Poly-D-Lysine 0.01%. Cells were fixed using a 4% paraformaldehyde (PFA) solution during 15 min at room temperature (RT) and were then stored at 4°C. Cells permeabilization (5 min with Triton X-100 0.1%) and saturation steps (30 min in Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1×, FBS 10% and Bovine Serum Albumin (BSA) 2%)

were done before labelling with primary antibodies during 90 min at RT or overnight at 4°C and secondary antibodies during 1 h at RT. For the susceptibility assay, a mouse monoclonal IgG1 anti-N RVFV was used, whereas for the apoptosis assay, rabbit IgG anti-cleaved caspase 3, a component of apoptosis pathway [34] and mouse ascitic polyclonal Ig anti-NSs [35] (kindly given by Dr M. Flamand (Institut Pasteur, France)) were used. Astrocytes pre-treated with 25 mM of H_2O_2 during 2 h were used as positive control for apoptotic-specific labelling [36]. Goat polyclonal IgG anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) antibody and DAPI were used for cytoskeleton of astrocytes and nuclear labelling, respectively. Antibodies, dilutions, and reagents are detailed on supplementary data, Table S1. Labelled coverslips were mounted on glass slides with mounting medium (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, France) and imaged by inversed microscope AXIOVERT A1 (Zeiss, France) using Archimed 6.1.4 software and analysed with Image J Software bundled with 64-bit Java 1.8.0_172. Infected and apoptotic cells were quantified by counting ≥1000 cells per sample.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) assays

To explore cell viability post-RVFV infection, monolayers of astrocytes were infected during indicated time points, or pre-treated with 25 mM of H_2O_2 during 2 h as positive control for apoptosis [36]. After infection, cells were trypsinized and then pelleted in PBS 1X supplemented with 10% FBS by centrifugation (RT, 250 × g, 10 min). Staining of the exposure of phosphatidylserine at the cell surface, described as a morphological cell change during apoptosis [34], was performed with Annexin V:FITC assay Kit (BioRad, ANNEX300F, France) following manufacturer's instructions using a one-step labelling. Following staining, cells were fixed with PFA 2% (20 min, RT). Data were then acquired by FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, France) and analysed by FlowJo v10.0.7 software.

Gene expression analysis

To explore the immune response induced by astrocytes after 48 h of RVFV infection, total RNA was extracted according to manufacturer's instructions (RNeasy mini kit, Qiagen, USA) and was treated for genomic DNA elimination using RNase-free DNase Set (Qiagen, USA). The quality and the concentration of the isolated total RNA from each sample were checked using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, France). Immune response was then screening by a two-step RT-qPCR kit targeting 84 different genes (Human Antiviral Response, Qiagen, USA, supplementary data, Table S2) on LightCycler 480 equipment following manufacturer's instructions (Roche, France). Cycle threshold (Ct) values of targeted genes were normalized using housekeeping genes included in the kit and fold-changes of transcripts level compared to those of uninfected condition were determined by online Qiagen Software (RT^2 Profiler PCR Data Analysis). If fold-change values were <1, online Qiagen Software converted value X with $-1/X$.

Cytokine and chemokine quantification

To explore the immune response induced by astrocytes after 48 h of RVFV infection at the protein level, harvested supernatants were tested using three types of LEGENDPlex kits (Human Anti-Virus Response Panel, Human pro-inflammatory chemokines Panel 1 and Human Neuroinflammation Panel 1, Biolegend, USA, supplementary data, Table S3) according to manufacturer's instructions. Fluorescent signals (APC, PE) were measured with flow cytometer Canto II (BD Biosciences, France) and data analysed using the online Biolegend software (LEGENDplexTM Data Analysis).

Nuclear mRNA export assay

To characterize the role of NSs factor on nuclear mRNA export in astrocytes after 48 h of RVFV infection, cell fractionation was performed on mock- and RVFV-infected astrocytes to separate nuclear and cytoplasmic fractions using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic extraction Reagents (Thermo Scientific, USA) following the manufacturer's instructions. Then, total RNA was extracted as previously described and retrotranscription was performed with oligo $(dT)_{18}$ using the Revert Aid First Strand cDNA synthesis kit (Fischer Scientific, USA) according to manufacturer's instructions. To quantify mRNA levels in each fraction, gene-specific qPCR was then realized using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche, Switzerland, supplementary data, Table S4).

Interferon assay

To determine the role of IFN response involved in the RVFV replication, astrocytes were pre-treated with three human recombinant IFN before infection: IFNα2 (pbl assay science, USA), IFNβ and IFNγ (R&D systems, USA). For these assays, cells were pre-treated with 500 UI/mL of each of the three IFN diluted in culture medium or with control (medium only) during 6 h. After IFN treatment, cells were infected during 24 h, then cells and supernatants were harvested as previously described.

Statistical analysis

Each infection was done at least, in triplicate for each condition and measured in duplicate for each sample. Each experiment corresponds at least to two independent infections. Depending on data distribution and the type of assays, ANOVA two-way, Student's *t*-test, Mann–Whitney test or Spearman correlation ($^{*}p < .05$, $^{**}p < .01$, $^{***}p < .001$, $^{****}p < .0001$) were used to analyse unpaired data with GraphPad Prism 9.5.0 software. For RT² Profiler PCR Data Analysis, online Qiagen software was used and data were analysed with Student's *t*-test.

Results

RVFV infects and replicates in human astrocytes

To evaluate the susceptibility of astrocytes to RVFV, primary human astrocytes were infected 48 h by RVFV strains Mayotte 2008 and MRU25010-30 and indirect immunofluorescence assays were performed on paraformaldehyde-fixed cells. We observed RVFV infection with the two RVFV strains using virus-specific labelling (antibody against the N nucleoprotein of RVFV) that was only present in infected astrocytes and absent in the mock-infected conditions (Figure 1(A)). However, we observed a significative strain-dependent variability at two days post-infection (dpi) in infection rates: MRU25010-30 infected 58.2% ± 8.74% of astrocytes while Mayotte 2008 infected 23.1% ± 7.82% (Figure 1(B)). We next determined RVFV replication rate by quantifying viral titres by TCID50 method in astrocyte supernatants harvested at different time points. This assay confirmed astrocyte permissiveness to RVFV: after 20 h post-infection (hpi), we showed a significant increase of viral titres for both strains, reaching a replication peak at 72 hpi (Figure 2). Furthermore, this assay confirmed the strain-dependent variability on infection rates. Indeed, MRU25010-30 displayed a significant replication between 12 and 16 hpi and Mayotte 2008 between 20 and 24 hpi. Similarly, MRU25010-30 had significant higher viral titres compared to Mayotte 2008 at each time point measured after 12 hpi.

Altogether, these results showed human astrocyte susceptibility and permissiveness to RVFV infection, but highlight a potential strain-dependent variability on infection efficiency.

Infection of astrocytes by RVFV induces apoptosis but the RVFV NSs potentially delays cell death

Next, we monitored the effect of RVFV infection on astrocyte homeostasis. Indeed, we observed important morphological changes of infected cells between 48 and 72 hpi compared to uninfected cells, notably cell shrinkage and rounding as well as a potential decrease of cell proliferation, possibly due to infection-induced early cellular toxicity (Figure 3(A)). To explore the possible mechanisms involved in cell death, we quantified apoptosis at different time points post-infection using FACS analysis on astrocytes labelled with Annexin V, which has a strong affinity for phosphatidylserine, an early morphological change at cell surface during apoptosis. Using this approach, we showed that apoptosis was induced over time by the two RVFV strains (Figure 3(B)). Interestingly, astrocytes began to express significantly extracellular phosphatidylserine at a later stage (i.e. between 72 and 96 hpi), in approximatively 20% of cells, for both viral strains.

To further explore the importance of the apoptotic pathway in RVFV-induced astrocyte mortality, we performed an immunofluorescence assay to detect the pro-apoptotic molecule activated- (or cleaved-) caspase 3, which is an essential protease of many apoptotic pathways, after 48 hpi. First, we confirmed specificity of cleaved-caspase 3 labelling since labelling was absent in mock-treated cells and present in H_2O_2 pre-treated cells, a positive control known to induce apoptosis (Figure 4(A)). Using this approach, we confirmed a significant induction of caspase 3 cleavage in RVFV-infected cells (Figure 4(A,B)). Corroborating the infectivity variability previously described, apoptosis induced by RVFV infection was also strain-dependent: we observed more cleaved-caspase 3 positive cells in MRU25010-30-infected astrocytes than in Mayotte 2008-infected cells (Figure 4(B)). A Spearman correlation between the number of apoptotic cells (cleaved-caspase 3 positive) and the number of infected cells independent of the strain used (RVFV positive) showed a positive and significant correlation between these two labelling ($r = 0.943$, $p < .0001$, $n = 4$, data not shown). Furthermore, the comparison of the fluorescence intensity showed that RVFV and cleaved-caspase 3 levels appear to be visually correlated (Figure 4(C)). Regardless of experimental conditions (i.e. mock- or RVFV-infected), this positive and quantitative correlation was confirmed by Spearman correlation between fluorescence intensity values of RVFV and cleaved-caspase 3 staining ($r = 0.76$, p-value $< .0001$, $n = 70$, data not shown). These results suggest that astrocyte infection by RVFV induces directly caspase 3 cleavage and that caspase 3 activation increases along with RVFV replication.

Because activated-caspase 3 staining was detected at earlier time than phosphatidylserine exposure at cell surface, this led us to monitor the potential effect of RVFV infection in the modulation of the apoptosis pathway. Given this and the nuclear filament-like localization of cleaved caspase 3, we next explored the potential role of NSs, a major virulence factor of RVFV known to form nuclear filaments in infected

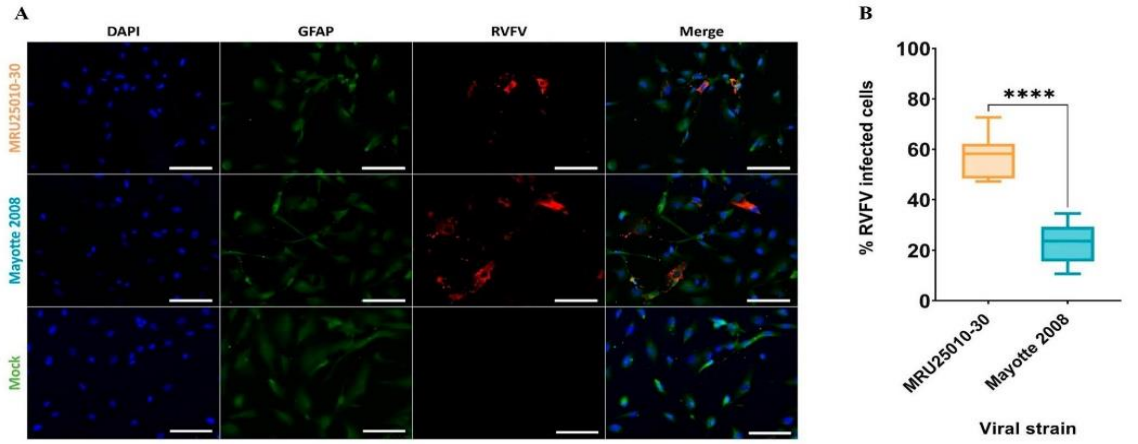


Figure 1. Human astrocytes are susceptible to RVFV infection. (A) Mock and RVFV-infected cells (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1) were fixed at two days post-infection (dpi) and labelled with a monoclonal anti-N RVFV antibody (red), anti-GFAP antibody (green), and DAPI (blue) (scale bar 100 µm). (B) RVFV-infected cells (%) analysed by counting infected labelled cells compared to total cells number at 2 dpi (counting ≥1000 cells, $n = 7$, *t*-test: ****p-value < .0001).

cells, in apoptosis modulation. First, immunolabelling of NSs in infected astrocytes confirmed the nuclear NSs filament location during MRU25010-30 and Mayotte 2008 infection, as well as its absence during NSs-deleted RVFV strain Clone 13 infection (Figure 4(D)). However, we could highlight a strain-dependent kinetic of nuclear filament formation: NSs fibrilization is more important after 48 h of MRU25010-30 infection compared to Mayotte 2008 infection (Mann–Whitney, p-value < .0001, $n = 45$, data not shown). The co-staining of NSs and cleaved-caspase 3 in MRU25010-30 and Mayotte 2008 infected astrocytes showed a colocalization of these two proteins in the nucleus of infected-astrocytes at 48 hpi, suggesting of a potential retention of cleaved-caspase 3 in the nucleus by NSs (Figure 4(D)).

Altogether, these results suggest that astrocytes RVFV infection induces directly early cell toxicity and activation of the apoptosis pathway (cleaved-caspase 3) but apoptosis establishment and cell mortality seem to be delayed by a potential nuclear sequestration of activated-caspase 3 by RVFV NSs filament.

RVFV astrocyte infection increases expression of genes related to interferon type I and inflammatory responses, without upregulation at the protein level by a potential nuclear sequestration of mRNA

To explore the immune response induced by RVFV-infected astrocytes after 48 h, we used a multi-array RT-qPCR assays. Independently of the viral strain, we showed an upregulation of numerous genes of the type I interferon (IFN) response: specific RNA virus pathogen recognition receptors (PRRs) components (*RLR: DDX58 (RIG-1), IFIH1/DHX58 (MDA5/LGP2)*), signalling pathway components (*IRF7*, *IRF5*, and *STAT1*), *IFNB1*, *IFNA2*, and antiviral effectors (*MX1*, *OAS2*, *ISG15*, and *APOBEC3G*) (Figure 5(A)). Furthermore, we detected an upregulation of others PRRs (*AIM2*, *NOD2*, *TLR7*, and *TLR8*), pro-inflammatory genes implicated in the cell inflammation signalling pathway (*NFKB*, *NFKBI (IKB)*, *TBK1*, *NRLP3*, and *TRIM25)* and pro-inflammatory cytokines and chemokines (*CCL3*, *CCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IL6*, *IL12*, *IL15*, *MEFV*, and *TNF*). Similarly, we showed an upregulation of genes implicated in the regulation of apoptosis (*CARD9*, *CASP10*, *FOS*, and *RIPK1*), which is consistent with previously observed apoptosis modulation, and other cell activities (*CTSS*, *CD86*, and *CYLD*). Furthermore, MRU25010-30 induced higher level of expression for these genes compared to Mayotte 2008, except for IFN effectors (*ISG15*, *MX1*, and *OAS2*), suggesting that Mayotte 2008 induces a more efficient IFN response. However, some genes were only overexpressed following MRU25010-30 infection, and notably genes encoding for others PRRs and components implicated in RNA virus recognition (*TLR9* and *TICAM1*), intracellular effectors and signals of inflammation (*AZI2*, *CHUK*, *CTSB*, *CTSL*, *DDX3X*, *IKBKB*, *IRAK1*, and *RELA*) and apoptosis (*JUN*, *TRAF3*, and *TRAF6*), as well as gene coding pro-inflammatory cytokines *IL1B*. Interestingly, only MRU25010-30 induced downregulation of *MAVS*, an important effector of IFN pathway. Mayotte 2008 infection also induced upregulation of specific genes such as *CAPS1*, *MYD88*, and *TLR3*.

We then investigated whether gene modulation was consistent with modulation at the protein level in supernatants of 48 h RVFV-infected cells compared to mock-infected conditions by FACS multiplex

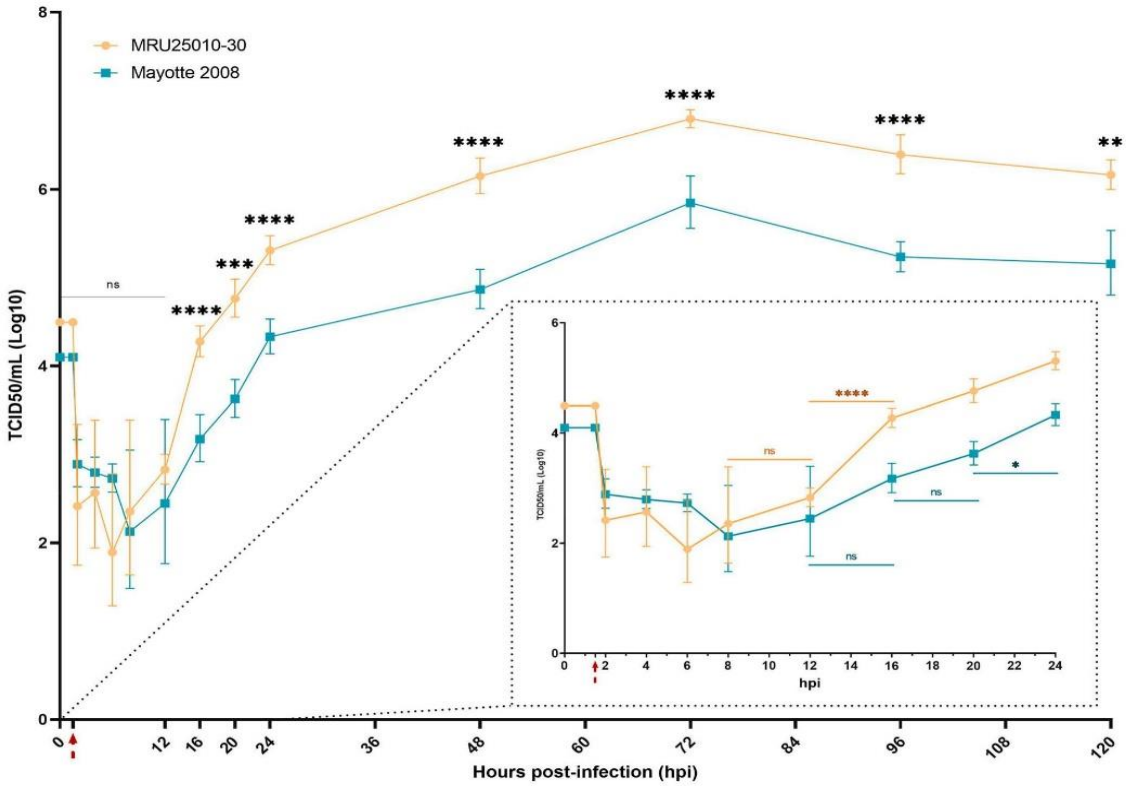


Figure 2. RVFV replicates in human astrocytes. Supernatants of mock- and RVFV-infected cells (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1) were harvested at different time points post-infection and titrated using the TCDI50 method (Red arrow: removal of inoculum). Dotted square shows early infection time points. Results are expressed as geometric mean ±95% confidence interval (CI) and ANOVA two-way test show significance between each strain at each time point (black) or show significance between two time points for one strain (coloured, early times dotted square) (*p*-value: **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001, *****p* < .0001).

assay. Interestingly only Mayotte 2008 induced an increased secretion of IFN-β, CXCL9, CXCL10, and CCL5, and only CXCL11 was increased for both RVFV strains infection (Figure 5(B)). Furthermore, for the remaining analysed proteins and for both strains, several proteins had a concentration equivalent of the mock-infected condition (CCL3, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18, sTREM-2, TNFα, TGF-β1, and VILIP-1) or had a lower concentration (BDNF, β-NGF, CCL2, CXCL1, CXCL5, sRAGE, sTREM-1, and VEGF).

At 48 hpi, when we compared mRNA upregulation level to protein concentration for analysed genes, we observed that MRU25010-30 infection did not induce an upregulation of protein despite a strong upregulation of their mRNA levels, except for CXCL11 (Figure 6(A)). However, Mayotte 2008 infection induced a lower upregulation of the same genes that MRU25010-30, but the secretion of some of these proteins was significantly increased (Figure 6(A)). Because these results suggested that RVFV could interfere with immune response mRNA translation or protein synthesis, we next monitored using FACS assays the kinetic of expression of pro-inflammatory cytokines (CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, and IL-8) at different time points after astrocyte infection by different RVFV strains (Figure 6(B)). MRU25010-30 only induced CXCL11 upregulation over time and a significant downregulation of IL8 at 72 hpi. Mayotte 2008 induced a significant upregulation of CCL5, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 over time and also a downregulation of IL8 at 72 hpi. Interestingly, the NSs-deleted strain Clone 13 induced a higher and earlier upregulation of all tested cytokines at 24 hpi with an increase over time. Indeed, despite CXCL9, other tested cytokines had a significant higher level at each time point during Clone 13 infection and compared to MRU25010-30 and Mayotte 2008 conditions. To explore the role of the NSs virulent factor of RVFV on protein synthesis inhibition, a cell fractionation was performed on mock- and RVFV-infected astrocytes at 48 hpi to obtain cytoplasm and nucleus components separately. Specific mRNA was quantified on each cell fraction by RT-qPCR (Figure 7). Compared to ΔCt ratio (Ct of cytoplasmic fraction subtracted by Ct of nucleus fraction for each sample) of mock and

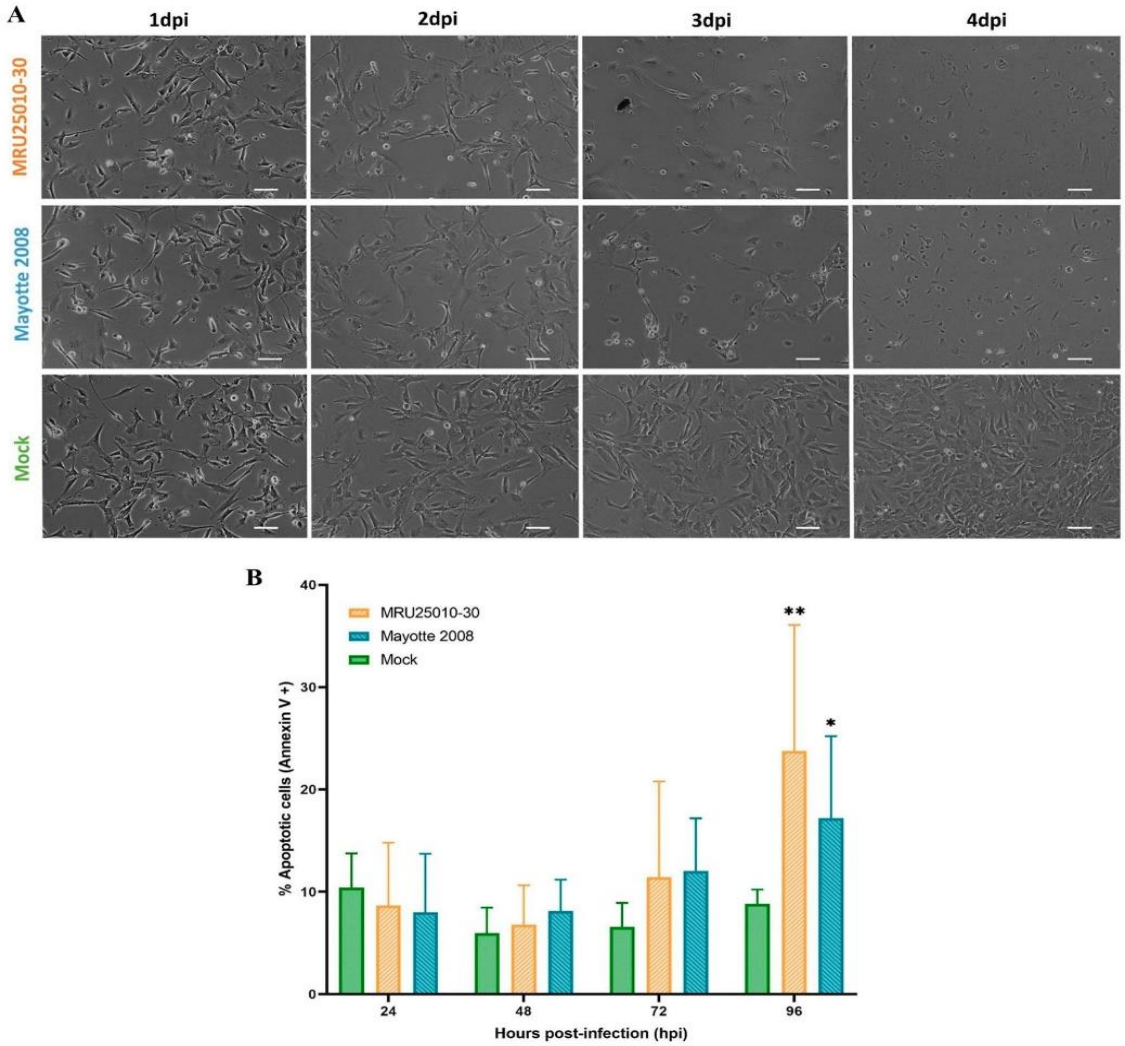


Figure 3. RVFV astrocyte infection induces early cell toxicity but a delayed apoptosis. (A) Cell morphology after RVFV infection analysed by phase contrast microscopy (scale bar 100 µm) at different days post-infection (dpi) in mock- and RVFV-infected cells (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1). (B) Annexin V staining of mock and RVFV-infected cells (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1) at different time points and measured by FACS. Results show percentage of cells positive for Annexin V expressed in mean ±95% confidence interval (Mann–Whitney: *p-value < .05, **p-value < .01).

Clone 13 controls, astrocytes infected with MRU25010-30 or Mayotte 2008 strains had a significantly higher proportion in the nucleus of mRNAs related to upregulated immune response genes (*IL6*, *CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IFNB1*, and *TNF*) and to other cellular factors (*BDNF*, *NGF*, and *VEGF*). However, astrocytes infected by NSs-deleted Clone 13 strain induced a higher proportion of mRNA in the cytoplasm (e.g. *IFNB1*) or have a distribution of mRNA not significantly different of the mock condition. Interestingly and except for *HPRT1*, *IFNB1*, *IL1B*, and *TNF*, the proportion of nuclear mRNAs is higher during the infection with MRU25010-30 compared to the infection with Mayotte 2008 (ANOVA two-way on ΔCt ratio, p < .01), corroborating strain-dependent variability of previous results on inhibition of protein secretion. Altogether, these results suggest that RVFV induces a type I IFN and inflammatory response during astrocyte infection, but modulates mRNA translation possibly through the NSs virulence factor by a strain-dependent inhibition of mRNA export from nucleus, and thus inhibits potent immune response establishment.

Interferon type I response inhibits RVFV replication

We next explored the role of IFNs in RVFV infection of astrocytes. For both strains, we showed that pre-

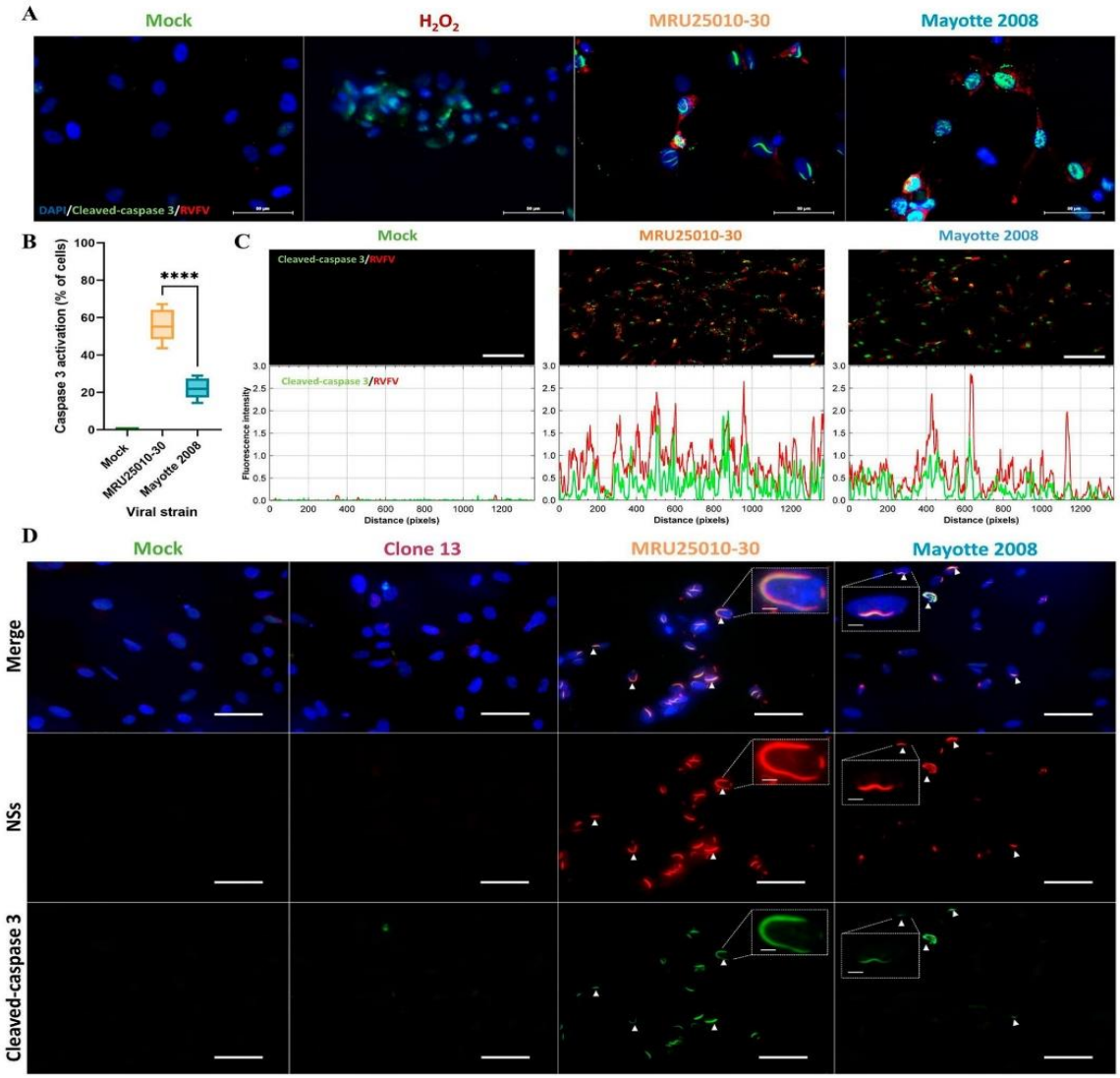


Figure 4. RVFV infection of astrocytes induces an early activation of caspase 3 and its potential intranuclear sequestration by NSs filaments. (A) Monitoring of cell apoptosis using mock-, H_2O_2 pre-treated – and RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1) fixed at two days post-infection (dpi) and labelled with anti-cleaved caspase 3 antibody (green, Cas3), anti-RVFV antibody (red), and DAPI (blue) (scale bar 50 µm), (B) Quantification of apoptosis in RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30 and Mayotte 2008, 2 dpi, MOI 0.1) by counting cleaved-caspase 3 labelled cells compared to total cell number (counting ≥ 1000 cells, $n = 6$, *t*-test: ****p-value < .0001). (C) Fluorescence intensity plots (bottom plots) measurement of indirect IFA pictures (top pictures, scale bar 200 µm) with anti-cleaved caspase antibody (green) and anti-RVFV antibody (red) in mock and infected conditions (MRU25010-30 and Mayotte 2008, 2 dpi, MOI 0.1). Intensity of fluorescence is calculated for each pixel in horizontal distance and for anti-RVFV signal (red) and anti-cleaved-caspase 3 signal (green). (D) RVFV NSs interaction with cleaved-caspase 3 was assay with mock and RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30, Mayotte 2008 and Clone 13, MOI 0.1) fixed at 2 dpi. Cells were labelled with anti-NSs antibody (red), anti-cleaved caspase 3 antibody (green), and DAPI (blue) (scale bar 50 µm, small scale bar 4 µm). Yellow labelling corresponding to the colocalization of cleaved-caspase 3 and NSs (examples of colocalization by white arrows).

treatment of astrocytes with type I IFN (IFN-α2 and IFN-β) induced a potent significant inhibition of viral particles formation (Figure 8). Indeed, type I interferon response decreases viral titres by 2.3 log10 and 1.7 log10 for MRU25010-30 and Mayotte 2008, respectively. Furthermore, there was no significant difference between IFN-α2 and IFN-β inhibition. Inducing type II IFN response by IFN-γ pre-treatment also inhibited significantly viral replication for both strains, by 1 log10 and 0.7 log10 for MRU25010-30 and Mayotte 2008, respectively, but this inhibition was significantly lower than type I IFN response (Figure 8).

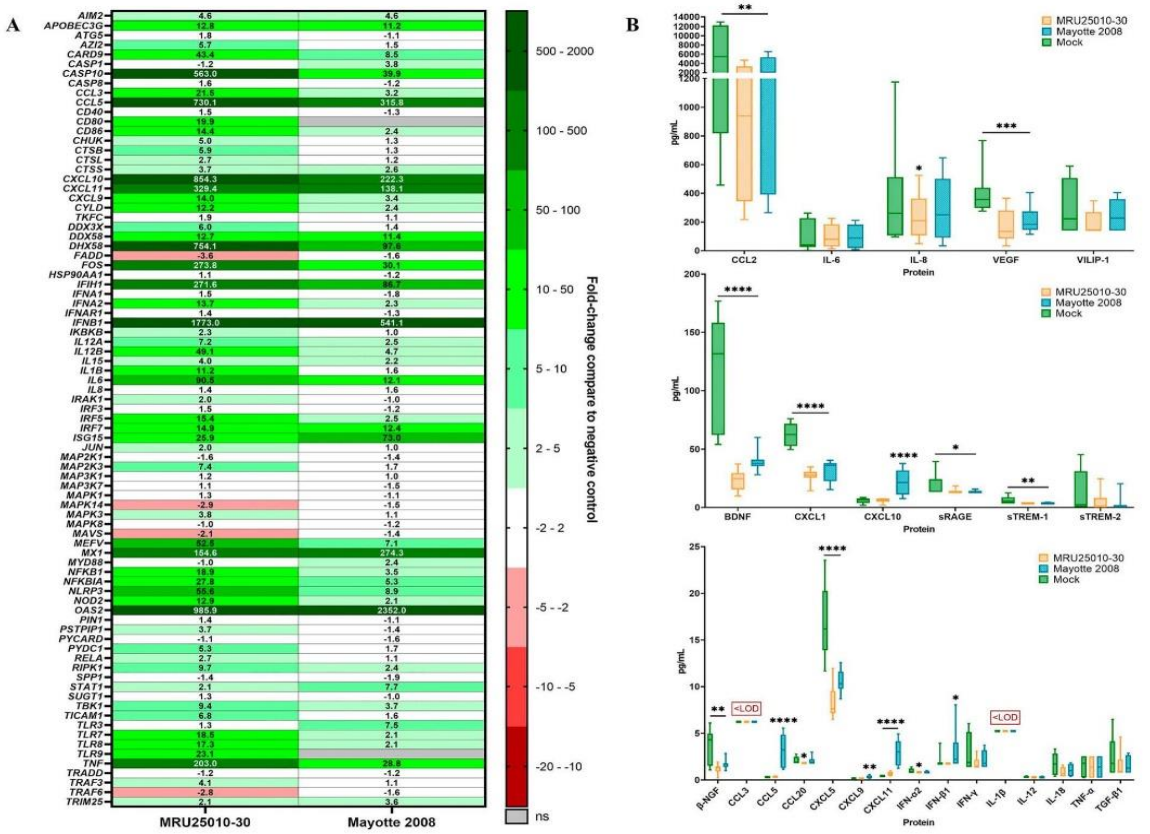


Figure 5. Astrocytes infection by RVFV induces inflammatory and antiviral responses at the mRNA level but not at the protein level. (A) Analyse of immune response induced by RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1) after 48 h post-infection (hpi) assayed by measuring gene mRNA upregulated (green) or downregulated (red) expression with RT-qPCR using fold-change method standardized on housekeeping genes. All presented results have a p-value < .05 (t-test) or ns for non-significant. (B) Cytokines secreted in RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 0.1, 2 dpi) were measured using FACS multiplex assays (LOD: Limit of Detection) and compared to mock concentration (Mann–Whitney test compared to mock concentration, p-value: *p < .05, **p < .01, ***p < .001, ****p < .0001, with black bar for both strains, and without a bar when only one strain is considered).

These results highlight the role of IFN responses, and notably type I IFN response, on RVFV replication inhibition by astrocytes and the importance for the virus to inhibit the IFN-related immune response to replicate efficiently. Type II interferon response also inhibited RVFV replication on astrocytes but at lower level.

Discussion

Here, we demonstrated that RVFV was able to infect human astrocytes in vitro in a strain-dependent manner. Furthermore, we showed that RVFV infection induced astrocyte apoptosis by activation of caspase 3 with the involvement of NSs, one of the major virulence factor of RVFV, probably delaying induced-apoptosis by a potential sequestration of cleaved-caspase 3 in nuclear filaments. Moreover, during infection, astrocytes induced upregulation of immune response genes expression, and in particular a type I interferon response genes, which was shown to efficiently modulate RVFV replication. However, immune response at the protein level was not upregulated through a potential viral-mediated and strain-dependent inhibition of mRNA nuclear export.

Astrocytes play crucial and multiple supporting roles in CNS homeostasis. Indeed, astrocytes have regulating functions on neuronal signalling and metabolism, on blood–brain barrier (BBB) by regulating its integrity and permeability, and also on CNS immune system and viral clearance [28,37,38]. Thus, infection of astrocytes by RVFV can affect directly and indirectly CNS homeostasis and possibly leading to cognitive impairment. Indeed, the death of astrocytes leading to a loss of their supporting role, or the amplification of the neuroinflammation mediators, can lead to a decrease in neuron viability or BBB disruption, and therefore perturbation of the CNS homeostasis [37,38]. Given this perturbation, it was described that astrocytes functionalities impairment

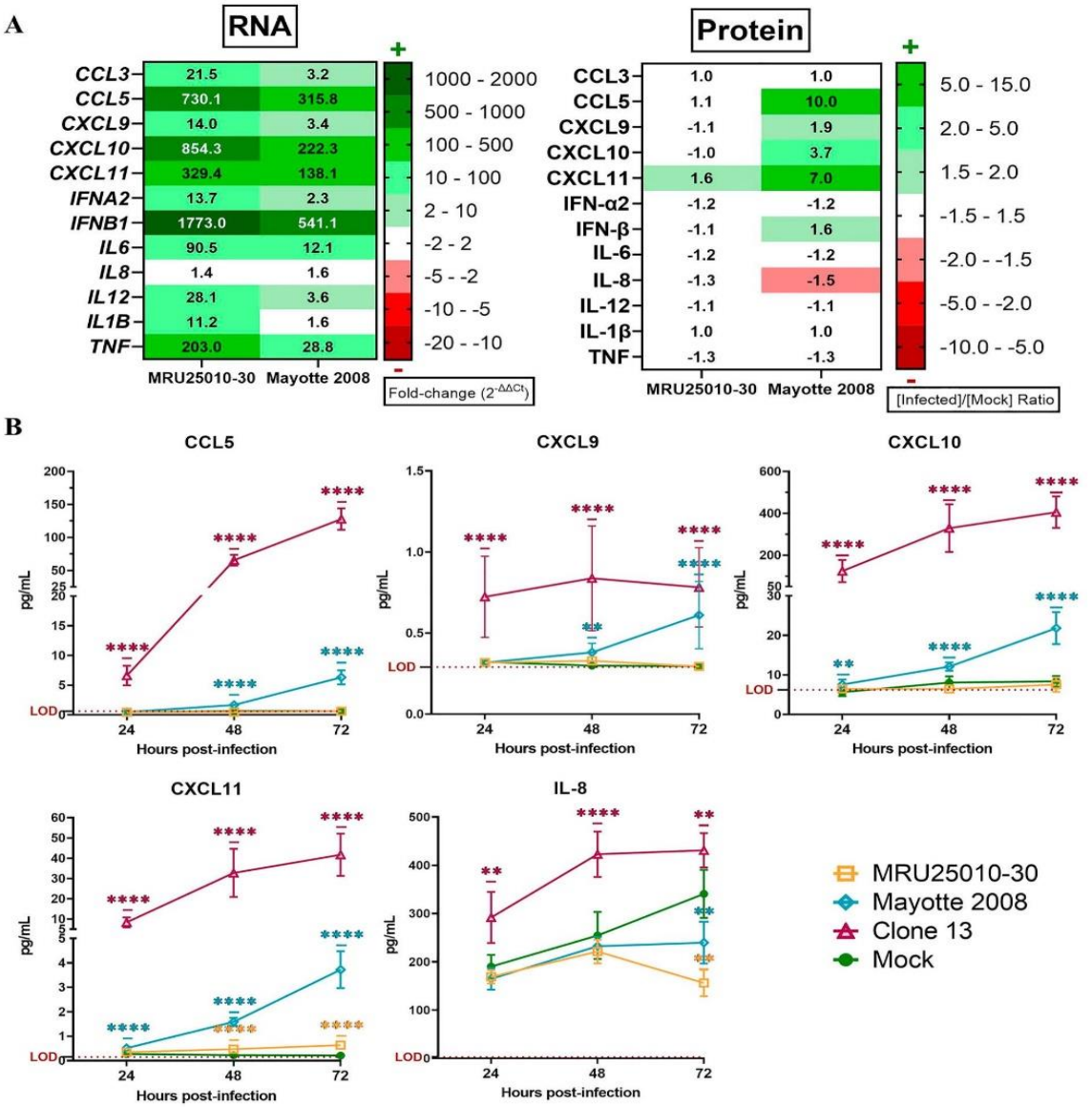


Figure 6. NSs potentially modulates astrocytes immune response by interfering with mRNA translation. (A) Comparison between mRNA and protein expression levels after 48 h post-infection (hpi) for specific genes: mRNA levels are expressed in fold-change and protein level with a ratio of mean protein concentration between infected and mock conditions. If protein ratio was under 1, value is expressed after −1/X conversion. (B) Kinetic of expression of inflammatory cytokines of RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30, Mayotte 2008 and Clone 13, a NSs-delated natural strain, MOI 0.1). Measurements of protein concentration were done using FACS multiplex assays (LOD: Limit of Detection) at 24, 48, and 72 hpi. Results show protein concentration expressed in mean ±95% confidence interval (Mann–Whitney test compared to mock concentration, *p*-value: **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001, *****p* < .0001).

play a crucial role in the neuropathogenesis of infection and can lead to cognitive, behavioural, and motor disturbances [39,40].

In human RVFV infections, necrosis foci were described in deadly neurological forms, but the mechanistic causes of cell mortality are still poorly described in RVFV infection [26]. Induction of apoptosis was described, notably by TNF secretion and by DNA damage signalling caused by NSs nuclear filaments [16,41]. Here, we showed that astrocyte mortality during RVFV is potentially caused by an activation of intrinsic apoptosis pathway (caspase 3-dependent apoptosis), which is concordant with previous studies [42]. Furthermore, our data suggest that RVFV infection induces direct apoptosis of infected cells, as activation of the caspase 3 pathway

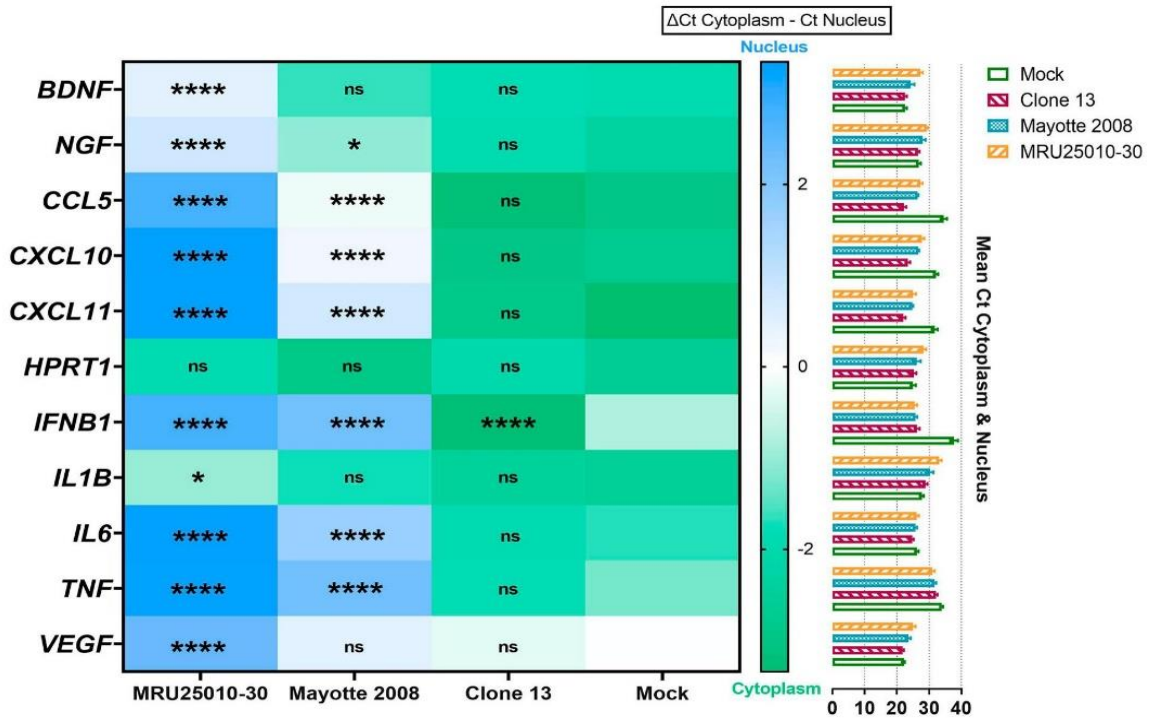


Figure 7. NSs potentially modulate immune response by inhibiting mRNA export from nucleus to cytoplasm. Relative quantities of mRNA related to housekeeping gene (*HPRT1*), to other cellular factors (*BDNF*, *NGF*, *VEGF*) or to immune response genes (*CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IFNB1*, *IL6*, *IL1B*, *TNF*) were explored in the different cell compartments by RT-qPCR on RVFV-infected astrocytes (MRU25010-30, Mayotte 2008 and Clone 13, a NSs-delated natural strain, MOI 0.1). After 48 h of RVFV infection, cell fractionation was performed on astrocytes to get separate cytoplasm and nucleus components followed by total RNA extraction. Relative quantification of mRNA was performed by RT-qPCR: the mean of Ct values ±95% confidence interval from cytoplasm and nucleus at each condition is mentioned on the right side of the figure. To determine nuclear export of specific genes, a ΔCt ratio was calculated for each sample by subtracting the Ct value of cytoplasm by the Ct value of nucleus. Mean of this ΔCt ratio and statistical values is represented as a heatmap (ANOVA two-way, test compared to mock ΔCt ratio, *p*-value: $^{ns}p > .05$, $^{*}p < .05$, $^{***}p < .001$, $^{****}p < .0001$).

is correlated with cell infection status, which is concomitant with the NSs-mediated DNA damage signal causing apoptosis.

Interestingly, the Non-Structural protein NSm is the virulent factor described in the anti-apoptotic activity by targeting protein at the mitochondrial outer membrane [43], but our result suggests that astrocyte apoptosis is potentially delayed by an anti-apoptotic activity of NSs filaments, and notably by hijacking activated-caspase 3 pathway by its nuclear sequestration. Indeed, activated-caspase 3 is responsible of scramblase activation, an enzyme leading to phosphatidylserine exposure at the cell surface [34] and, despite an early activation of caspase 3, the proportion of cells with extracellular phosphatidylserine outer membrane exposition was lower and only at a later stage of infection. Moreover, we showed that NSs filaments and activated-caspase 3 are both located in the same nuclear filaments, suggesting a potential sequestration role of NSs. Similarly, a recent report showed colocalization of NSs and activated-caspase 3 in the liver of RVFV-infected mice [44]. However, it will be interesting to explore molecular mechanisms allowing interactions between NSs and activated-caspase 3, using a quantitative evaluation of this specific function of NSs on viral replication.

Here, analyses of upregulated mRNAs during astrocytes infection showed a potent activation of RLR, type I IFN response and pro-inflammatory responses. These results are consistent with a ssRNA virus infection and following MAVS activation, which was already described as an important mediator to the establishment of a protective immune response in the brain of mice during RVFV infection [18,45,46]. Interestingly, we showed a potent upregulation of *IFNB1* mRNA, which was described as inhibited during RVFV infection [29,46]. Indeed, it was already described that NSs plays a crucial role in anti-type I IFN (IFN-α and IFN- β) activity, and notably by interaction with SAP30, leading to the suppression of IFN gene activation [29]. Furthermore, NSs anti-transcriptional activity on inducible and consistent general transcription was also described, and notably by its

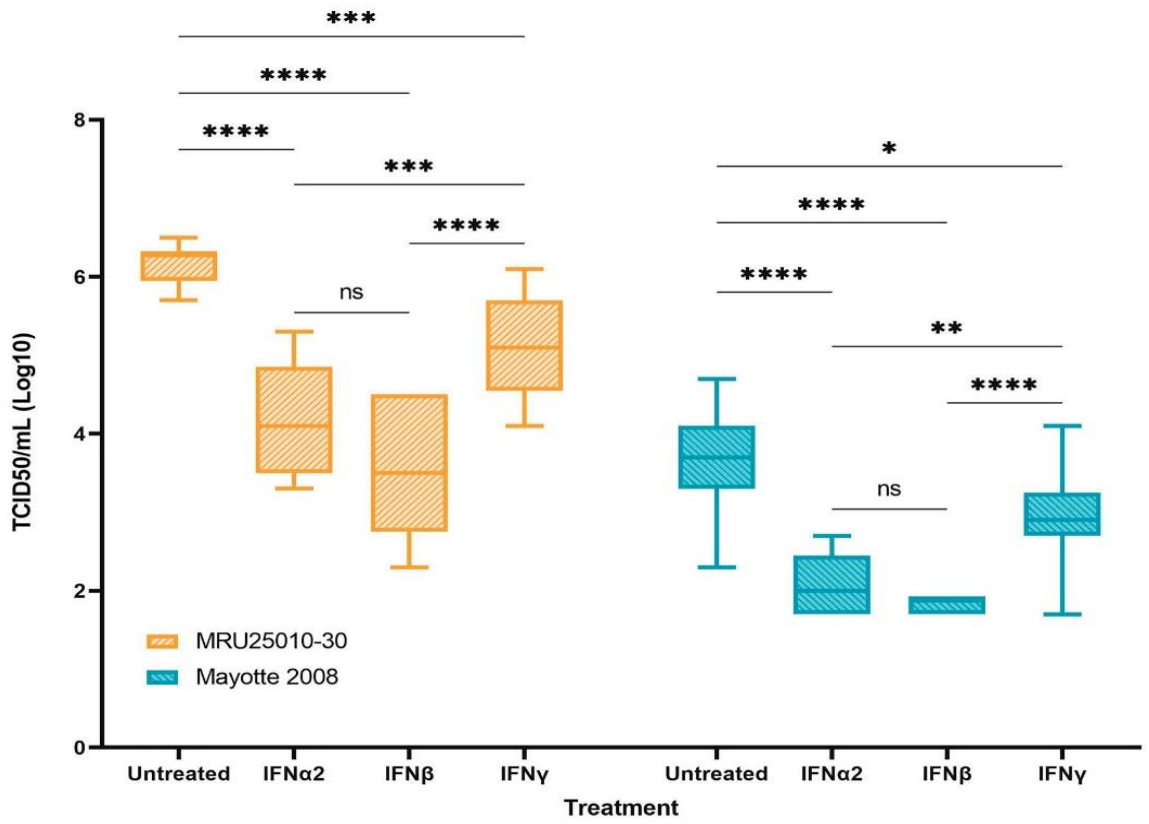


Figure 8. Type I and type II responses inhibit RVFV replication. In order to explore the role of the antiviral response induced by infected astrocytes on RVFV infection, RVFV titers of IFN pre-treated astrocytes (IFN-α2, IFN-β, and IFN-γ) are compared to pre-treated controls (medium only), 24 h post-infection with the two RVFV strains MRU25010-30 and Mayotte 2008. Viral titres were determined by TCID50 method (ANOVA two-way: *p*-value: **p* < .05, ***p* < .01, ****p* < .001, *****p* < .0001).

interaction with the transcriptional factor II H (TFIIH) [47]. In contrast, our results highlight a strong upregulation of genes associated with type I IFN, pro-inflammatory component and pro-apoptotic responses. This upregulation was already described in mouse models during RVFV infection of the liver, but at lower level in the spleen, suggesting an organ-dependent variability of transcriptional inhibition [48]. Whether this is due to the viral strain or the cell type studied remains to be determined.

Nevertheless, we showed an inhibition of the immune responses at translational level. Indeed, despite a potent upregulation of mRNAs, RVFV infection did not lead, and notably for the strain MRU25010-30, to an increase of secreted proteins concentration in cell supernatants. Moreover, for both strains, some cellular factors such as BDNF or β-NGF have a decreased concentration in infected conditions, suggesting that general cellular translation is potentially affected. To confirm these observations, it would be interesting to quantify the intracellular proteins which mRNAs were shown to be upregulated, such as *OAS2* or *RLR*, or enlarge studied proteins. Here, we showed that NSs was able to form nuclear filaments in astrocytes, filaments that were described as inhibitors of mRNA nuclear export [49], and thus possibly inhibiting translation of mRNAs and protein synthesis. Corroborating with this hypothesis, we showed that astrocytes infection by a NSs-deleted strain (Clone 13) induced a potent secretion of cytokines and chemokines that are limited or totally inhibited in Mayotte 2008 and MRU25010-30 infection. Furthermore, and corroborating with literature, our results confirm this hypothesis and highlight a mechanism of inhibition of mRNA nuclear export in astrocytes infected by MRU25010-30 and Mayotte 2008. Moreover, this mechanism seems strain-dependent and then possibly explains the strain-dependent infectivity of the RVFV strains used in this study. Thus, our results suggest that RVFV NSs play potentially an important role in inhibiting astrocyte protein synthesis by blocking mRNA nuclear export and thus inhibiting immune response establishment.

Furthermore, it seems crucial for RVFV to inhibit the viral-specific immune response, and notably IFN

type I. Indeed, it was described that IFN type I, lead to an inhibition of RVFV genome replication at the early phase of infection, which is consistent with our results, and immune response lead to viral clearance at later stage by adaptative immunity activation [25,46]. Thus, variability on NSs anti-immune activity could correlate with replication variability of RVFV strains. Indeed, we showed that the higher virulent strain had potentially a faster NSs nuclear filament formation [50], inhibited more efficiently immune response and replicated earlier and at higher viral titres. In agreement with this hypothesis, our data showed that infection by the less virulent strain with slower NSs fibrilization induces a higher upregulation of IFN response effectors, a lowest inhibition of mRNA nuclear export and a significant secretion of IFN-β in astrocytes supernatant, suggesting a more effective IFN response of astrocytes.

During RVFV epidemics, human manifestations can harbour an important inter-individual variability in terms of severity and correlate with hosts immune response [51]. This crucial role of early innate immune response, and notably type I, was also described in mice and NHP [20,52]. Thus, variability of the severity of neurological forms of RVF could be explained by the strain variability of anti-immune activity of NSs. Indeed, NSs filament formation in infected cells was described as a crucial factor for neurovirulence in the mouse model [50]. Firstly, this inhibition promotes viral replication and it was described that viral titres positively correlate with mortality during RVFV infection [53,54]. Moreover, in humans, inhibition or dysregulation of the immune response induced by RVFV was already described [53,55], but the role of this response in RVFV pathogenesis is still discussed [26]. In the rodent model, RVFV dysregulation of the immune response coincides with tissue damage, late BBB disruption, potent recruitment of inflammatory cells, and adaptative immune cells to the brain, but the direct impact of dysregulated immune response on tissue damage is still unanswered [21–24]. Our study showed this immune dysregulation at an early stage of human glial cell infection, allowing RVFV replication and cell death by apoptosis, and dysregulation of immune regulation of adaptative response, but does not allow us to conclude about the consequences of this dysregulation at later stages of infection.

To conclude, our study showed a potent and strain-dependent impairment of human astrocytes during RVFV infection as well as a strain-dependent inhibition of the induced immune response, thus potentially promoting viral replication. Neurological disorders could be caused partially by infection of astrocytes and then indirectly by the early dysregulation of CNS homeostasis. Moreover, origin of strain-dependent variability and the implication of a dysregulated immune response on later nervous tissue damage are still uncertain and remained to be explored.

Acknowledgements

We are thankful to Dr Marie Flamand (Institut Pasteur, Paris, France) for the gift of RVFV mouse anti-NSs antibodies. Special thanks to ONARDEP (Dr Bezeid Ould El Mamy) and ISRA-LNERV (Dr Moustapha Modou Lo) for fieldwork and sample collection and isolation. This work was publicly funded by the Montpellier University of Excellence (MUSE) through the KIM-RIVE initiative, and the ANR (the French National Research Agency) under the ANR-21-CE15-0041-02, and the FEDER-INTERREG-TROI program under the DP One Health-OI initiative (http://www.onehealth-oi.org)

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported by MESRI.

References

[1] Venter M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. Curr Opin Virol. 2018;28:74–84.
[2] Carlson CJ, Albery GF, Merow C, et al. Climate change increases cross-species viral transmission risk. Nature. 2022;607:555–562.
[3] Muñoz LS, Garcia MA, Gordon-Lipkin E, et al. Emerging viral infections and their impact on the global burden of neurological disease. Semin Neurol. 2018;38:163–175.
[4] Daubney R, Hudson JR. Enzootic hepatitis or rift valley fever. An un-described virus disease of sheep, cattle and man from east Africa. J Pathol Bacteriol. 1931;34:545–579.
[5] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQQ, et al. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses (2017). Arch Virol. 2017;162:2505–2538.
[6] McMillen CM, Hartman AL. Rift valley fever in animals and humans: current perspectives. Antiviral Res. 2018;156:29–37.
[7] Wright D, Kortekaas J, Bowden TA, et al. Rift Valley fever: biology and epidemiology. J Gen Virol. 2019;100:1187–1199.
[8] Métras R, John Edmunds W, Youssouffi C, et al. Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic. PNAS. 2020;117:24567–24574.
[9] Javelle E, Lesueur A, de Santi V P, et al. The challenging management of Rift Valley fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2020;19:4.

[10] Ikegami T, Makino S. The pathogenesis of Rift Valley fever. Viruses. 2011;3:493–519.
[11] Mohamed M, Mosha F, Mghamba J, et al. Epidemiologic and clinical aspects of a rift valley fever outbreak in humans in Tanzania, 2007. Am J Trop Med Hyg. 2010;83:22–27.
[12] Anywaine Z, Lule SA, Hansen C, et al. Clinical manifestations of Rift Valley fever in humans: systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16:e0010233.
[13] van Velden DJ, Meyer J, Olivier J, et al. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. S Afr Med J. 1977;51:867–871.
[14] Hartman AL, Powell DS, Bethel LM, et al. Aerosolized Rift Valley fever virus causes fatal encephalitis in African green monkeys and common marmosets. J Virol. 2014;88:2235–2245.
[15] Smith DR, Steele KE, Shamblin J, et al. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. Virology. 2010;407:256–267.
[16] Odendaal L, Davis AS, Venter EH. Insights into the pathogenesis of viral haemorrhagic fever based on virus tropism and tissue lesions of natural Rift Valley fever. Viruses. 2021;13:709.
[17] Reed C, Steele KE, Honko A, et al. Ultrastructural study of Rift Valley fever virus in the mouse model. Virology. 2012;431:58–70.
[18] Weilhammer DR. Investigating the role of innate immunity in viral encephalitis caused by Rift Valley fever virus; Lawrence Livermore National Laboratory. LLNL-TR-795766. 2019;1–9.
[19] Gommet C, Billecocq A, Jouvion G, et al. Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:e1421.
[20] do Valle TZ, Billecocq A, Guillemot L, et al. A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. J Immunol. 2010;185:6146–6156.
[21] Gray KK, Worthy MN, Juelich TL, et al. Chemotactic and inflammatory responses in the liver and brain are associated with pathogenesis of rift valley fever virus infection in the mouse. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1529.
[22] Dodd KA, McElroy AK, Jones TL, et al. 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 Negl Trop Dis. 2014;8(6):e2874.
[23] Albe JR, Boyles DA, Walters AW, et al. Neutrophil and macrophage influx into the central nervous system are inflammatory components of lethal Rift Valley fever encephalitis in rats. PLoS Pathog. 2019;15:e1007833.
[24] Walters AW, Kujawa MR, Albe JR, et al. Vascular permeability in the brain is a late pathogenic event during Rift Valley fever virus encephalitis in rats. Virology. 2019;526:173–179.
[25] Dodd KA, McElroy AK, Jones MEB, et al. Rift Valley fever virus clearance and protection from neurologic disease Are dependent on CD4 + T cell and virus-specific antibody responses. J Virol. 2013;87:6161–6171.
[26] Bird BH, McElroy AK. Rift Valley fever virus: unanswered questions. Antiviral Res. 2016;132:274–280.
[27] Connors KA, Hartman AL. Advances in understanding neuropathogenesis of Rift Valley fever virus. Annu Rev Virol. 2022;9:437–450.
[28] Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. Immune players in the CNS: the astrocyte. J Neuroimmune Pharmacol. 2013;8:824–839.
[29] Ly HJ, Ikegami T. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins. Virol J. 2016;13:118.
[30] Mamy AB E, Lo MM, Thiongane Y, et al. Comprehensive phylogenetic reconstructions of Rift Valley fever virus: the 2010 northern Mauritania outbreak in the Camelus dromedarius species. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014;14:856–861.
[31] Cêtre-Sossah C, Zeller H, Grandadam M, et al. Genome analysis of Rift Valley fever virus, Mayotte. Emerg Infect Dis. 2012;18:969–971.
[32] Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, et al. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. Am J Trop Med Hyg. 1995 [cited 2022 Dec 5];53:405–411.
[33] Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Epidemiol. 1938;27:493–497.
[34] Ketelut-Carneiro N, Fitzgerald KA. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis – Oh My! The many ways a cell Can Die. J. Mol. Biol. 2022;434:167378.
[35] Yadani F-Z, Kohl A, Préhaud C, et al. The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley fever virus NSs protein Is essential for the formation of filamentous structures but Not for the nuclear localization of the protein. J Virol. 1999;73:5018–5025.
[36] Shin JH, Kim SW, Lim CM, et al. αB-crystallin suppresses oxidative stress-induced astrocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 activation. Neurosci Res. 2009;64:355–361.
[37] Clé M, Eldin P, Briant L, et al. Neurocognitive impacts of arbovirus infections. J Neuroinflammation. 2020;17:233.
[38] Soung A, Klein RS. Viral encephalitis and neurologic diseases: focus on astrocytes. Trends Mol Med. 2018;24:950–962.
[39] De Keyser J, Mostert JP, Koch MW. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. J Neurol Sci. 2008;267:3–16.
[40] Lee H-G, Wheeler MA, Quintana FJ. Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases. 2022;21:339–358.
[41] Baer A, Austin D, Narayanan A, et al. Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication. J Biol Chem. 2012;287:7399–7410.
[42] Won S, Ikegami T, Peters CJ, et al. NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. J Virol. 2007;81:13335–13345.
[43] Terasaki K, Won S, Makino S. The C-terminal region of Rift Valley fever virus NSm protein targets the protein to the mitochondrial outer membrane and exerts antiapoptotic function. J Virol. 2013 [cited 2022 Dec 20];87:676–682.
[44] Michaely LM, Rissmann M, Armando F, et al. Rift Valley fever virus Non-structural protein S is associated with nuclear translocation of active caspase-3 and inclusion body formation. Viruses. 2022;14:2487.
[45] Hum NR, Bourguet FA, Sebastian A, et al. MAVS mediates a protective immune response in the brain to Rift Valley fever virus. PLoS Pathog. 2022;18:1–28.
[46] Wuerth JD, Weber F. Phleboviruses and the type I interferon response. Viruses. 2016;8:174.

[47] Le May N, Dubaele S, De Santis L P, et al. TFIIH transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus viremia, and leads to miscarriage in pregnant animals, resulting in economic disaster in African countries. RVFV possesses a single-stranded segmented RNA genome. Cell. 2004;116: 541–550.

[48] van Vuren P J, Tiemessen CT, Paweska JT. Anti-nucleocapsid protein immune responses counteract pathogenic effects of Rift Valley fever virus infection in mice. PLoS One. 2011;6(9):e25027.

[49] Copeland AM, van Deusen NM, Schmaljohn CS. Rift Valley fever virus NSS gene expression correlates with a defect in nuclear mRNA export. Virology. 2015;486:88–93.

[50] Léger P, Nachman E, Richter K, et al. NSs amyloid formation is associated with the virulence of Rift Valley fever virus in mice. Nat Commun. 2020;11:3281.

[51] Hise AG, Traylor Z, Hall NB, et al. Association of symptoms and severity of rift valley fever with genetic polymorphisms in human innate immune pathways. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0003584.

[52] Wonderlich ER, Caroline AL, McMillen CM, et al. Peripheral blood biomarkers of disease outcome in a monkey model of Rift Valley fever encephalitis. J Virol. 2018;92:e01662-17.

[53] Vuren PVJ, Shalekoff S, Grobbelaar AA, et al. Serum levels of inflammatory cytokines in Rift Valley fever patients are indicative of severe disease. Virol J. 2015;12:159.

[54] Njenga MK, Paweska J, Wanjala R, et al. Using a field quantitative real-time PCR test to rapidly identify highly viremic rift valley fever cases. J Clin Microbiol. 2009;47:1166–1171.

[55] McElroy AK, Nichol ST. 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. 2012;422:6–12.

III. Travaux préliminaires sur l'identification du récepteur cellulaire impliqué dans l'internalisation du RVFV par les astrocytes

Après avoir confirmé la permissivité des astrocytes à l'infection par le RVFV, la caractérisation du récepteur potentiel permettant au RVFV d'infecter les astrocytes a également été envisageée. En effet, les astrocytes expriment les deux récepteurs décrits, à ce jour, pour le RVFV : le récepteur DC-SIGN et le récepteur LRP1[37,259,262,477,478]. Le récepteur DC-SIGN est un récepteur de type C lectine présent à la surface de différents types cellulaires, et notamment des CPA tels que les macrophages et les cellules dendritiques. En effet, ce récepteur est un PRR capable de reconnaître des PAMP viraux spécifiques (oligosaccharides riches en mannose des enveloppes virales) et est impliqué dans de nombreuses fonctions immunitaires[37,259,479]. Le récepteur LRP1 est, quant à lui, un récepteur de la famille des récepteurs LDL, des récepteurs cellulaires exprimés de façon ubiquitaire, mais d'intensités variables dans l'organisme, et participant à l'homéostasie du cholestérol. Ce récepteur joue un rôle clé dans l'endocytose des lipoprotéines de faible densité et riches en cholestérol. De plus, LRP1 régule certaines cascades signalétiques intracellulaires impliquées dans de nombreux processus cellulaires[264,480]. Afin d'explorer le rôle de ces récepteurs dans l'internalisation du RVFV dans les astrocytes, une approche d'interférence *in vitro* pour chaque récepteur a été utilisée à l'aide, soit d'anticorps bloquants spécifiques, soit de molécules antagonistes. Un biais technique lié à l'absence de contrôle positif fonctionnel n'a pas permis de valoriser ces résultats préliminaires dans la publication présentée précédemment, mais ils sont cependant présentés dans cette partie[481].

Les méthodes de culture cellulaire, d'infection des astrocytes et de quantification virale par titrage TCID50 sont identiques à celles décrites dans la publication précédente[481]. Les deux mêmes souches de RVFV isolées du terrain, MRU25010-30 et Mayotte 2008, ont été utilisées dans cette approche et toutes les dilutions (anticorps bloquants, molécules antagonistes, souches virales) ont été réalisées dans le milieu de culture spécifique des astrocytes (Astrocyte Medium, ScienCell). Avant leur infection et en fonction des préconisations des auteurs ou des fournisseurs, les astrocytes ont été prétraités pendant 1h avec différentes dilutions d'anticorps anti-DC SIGN humain (0,5 ou 5µg/mL), d'anticorps contrôle (anti-CD11 bovin, 5µg/mL), d'un ligand antagoniste du LRP1 (LRPAP, 0.5 ou 5 µg/mL) ou d'un contrôle négatif de pré-traitement (BSA, 5µg/mL) (Annexe 5)[262,482]. Après pré-traitement, les astrocytes ont été infectés avec une MOI de 0,1 par chacune des 2 souches de RVFV puis l'infection a été maintenue jusqu'au temps le plus précoce où l'augmentation du titre viral est significative pour chaque souche, soit 16 heures post-infection (hpi) pour MRU25010-30 et 24hpi pour Mayotte 2008. Les inocula viraux ainsi que les milieux de cultures post-infection ont également été préparés avec le traitement adapté en fonction de la condition testée. Deux contrôles ont été intégrés à l'expérience : un contrôle sans pré-traitement et un contrôle avec un pré-traitement aberrant (anticorps anti-CD11 bovin, BSA). Initialement, des contrôles positifs d'inhibition de l'entrée virale par ces traitements devaient être ajoutés (ZIKV pour l'interférence de DC-SIGN ou DENV-2 pour l'interférence de LRP1), mais ceux-ci n'ont finalement pas été inclus suite à des problèmes techniques (défaut de production du stock viral, absence de reproductibilité avec la littérature)[483–485]. De ce fait, les résultats préliminaires n'ont pas pu être valorisés et nécessitent d'être poursuivis.

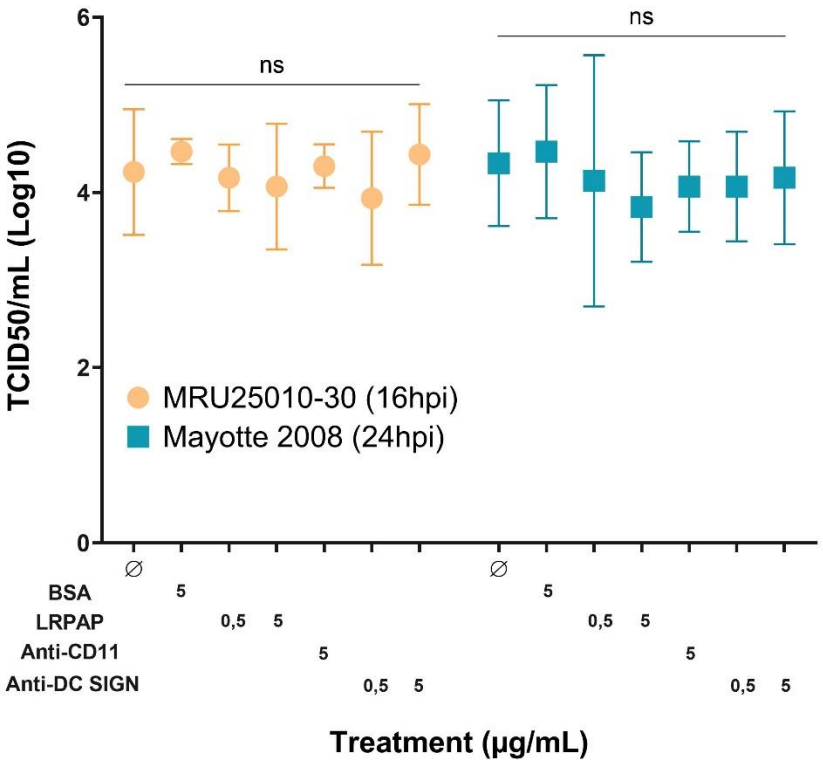


Figure 27 : Le RVFV ne semble pas infecter les astrocytes via les récepteurs LRP1 et DC-SIGN. Afin d'identifier le récepteur astrocytaire impliqué dans l'internalisation du RVFV, les titres viraux obtenus suite à l'infection d'astrocytes non-prétraités (milieu de culture seul, ø) ou prétraités avec différentes concentrations (0,5 ou 5µg/mL) de molécules interférant avec le récepteur DC-SIGN (anti-DC-SIGN, contrôle anti-CD11) ou le récepteur LRP1 (LRPAP, contrôle BSA) ont été déterminés par la méthode TCID50 après 16 heures post-infection (hpi) (MRU25010-30, orange) ou 24hpi (Mayotte 2008, bleu). Les résultats exprimés en TCID50/mL sont représentés par la moyenne +/- l'intervalle de confiance 95% de chaque condition (One Way ANOVA, chaque souche indépendamment, *n*=3, ns : non-significatif).

Suite à cette expérimentation, il sembler que ni LRP1 ni DC-SIGN ne soient impliqués dans l'internalisation du RVFV lors de l'infection des astrocytes humains, et cela pour les deux souches utilisées (Figure 28). En effet, que ce soit pour MRU25010-30 ou Mayotte 2008, il n'y a pas de différence significative entre les titres viraux mesurés et les différents pré-traitements. Ainsi, le pré-traitement des astrocytes par le ligand antagoniste de LRP1, le LRPAP, n'influence pas la réplication du RVFV, tout comme le pré-traitement par un anticorps bloquant le récepteur DC-SIGN. De ce fait, les résultats de ces travaux suggèrent que le RVFV pourrait utiliser un autre récepteur cellulaire pour infecter les astrocytes. Pour les virus de la classe des *Bunyaviricetes*, l'interaction avec le récepteur cellulaire est médiée par leurs glycoprotéines de surface, et il se pourrait donc que certains récepteurs soient communs entre les différentes familles de virus, comme c'est le cas pour le récepteur DC-SIGN qui est utilisé par des virus de la famille des *Arenaviridae* (LASV, LCMV), des *Peribunyaviridiae* (LACV), des *Nairoviridae* (CCHFV), et des *Phenuiviridae* (RVFV, TOSV, UUKV, SFTSV). A l'inverse, il se pourrait également que des récepteurs décrits pour ces virus soient utilisés par le RVFV, tels que NMMHC-IIA, Tyro3 ou encore AXL[486]. AXL représente d'ailleurs un candidat intéressant pour l'infection virale des astrocytes, celui-ci ayant été décrit comme impliqué dans l'infection des astrocytes par ZIKV[483]. Cependant, il se pourrait également que les conclusions de ces travaux préliminaires soient erronés dû au biais technique présenté précédemment. LRP1 étant décrit comme un récepteur majeur du RVFV, ubiquitaire et crucial dans la pathogénèse hépatique, il semble donc important de conforter ces résultats préliminaires[262,263].

Chapitre 2 : Neuroinvasion du RVFV

I. Exploration de l'interaction entre le RVFV et la BHE humaine : vers un potentiel mécanisme de neuroinvasion

Après avoir confirmé le neurotropisme *in vitro* du RVFV, notamment par l'infection des astrocytes humain dans le chapitre 1, il semble également important de définir le mécanisme potentiel permettant au RVFV d'accéder au SNC humain. Différentes barrières régulent finement les échanges entre le SNC et le reste de l'organisme afin de protéger ce système biologique essentiel. Cependant, les virus ont développé différentes stratégies de neuroinvasion pour accéder au SNC : soit via la voie non-hématogène via les axones, soit via la voie hématogène permettant aux virus d'accéder au SNC par le système sanguin qui l'irrigue. Cette dernière voie a été très peu explorée, que ce soit chez l'Homme ou chez les modèles animaux. Or, le RVFV est un virus responsable d'une fièvre hémorragique virale induisant une virémie importante et potentiellement capable d'infecter les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins périphériques, comme c'est le cas chez le mouton par exemple[330]. De plus, la voie non-hématogène a été décrite comme peu probable en-dehors de l'épithélium olfactif pour le RVFV. Ainsi, il semble important d'évaluer la capacité du RVFV à accéder au SNC par la voie hématogène, et notamment par infection directe de l'endothélium vasculaire spécifique protégeant le SNC : la BHE. Pour ce faire, la permissivité de la BHE humaine au RVFV a été déterminée à l'aide d'un modèle *in vitro* de BHE humaine imitant les compartiments sanguins et cérébraux ainsi que sa sélectivité[472–474]. Afin d'explorer la neuroinflammation induite par cette infection, la réponse immunitaire, le recrutement des cellules immunitaires qui en découle ainsi que le maintien de la fonction barrière ont également été explorés. De plus, les astrocytes étant des acteurs majeurs de la NVU dans le maintien de la BHE, leur rôle dans cette interaction a également été exploré. Pour finir, des résultats préliminaires en lien avec l'exploration d'un potentiel mécanisme de cheval de Troie par le RVFV ainsi que les mécanismes moléculaires de recrutement des cellules immunitaires à la BHE infectée par le RVFV sont présentés à la fin de ce chapitre.

Il a ainsi pu être confirmé que le RVFV peut accéder au SNC humain par la voie hématogène, et notamment par le mécanisme de neuroinvasion par infection directe des cellules endothéliales de la BHE. De plus, la permissivité au RVFV plus importante des cellules endothéliales par rapport aux péricytes a été observée, suggérant le rôle direct des cellules endothéliales dans la neuroinvasion du RVFV. Ce travail a également démontré que, malgré l'infection des cellules endothéliales, des péricytes ou même des astrocytes, il n'y a pas de perturbation de la fonction barrière de la BHE. Cette observation est très probablement corrélée à un mécanisme d'élimination progressive des cellules endothéliales, sans rupture des jonctions intercellulaires, ainsi qu'à l'absence de sécrétion de médiateurs inflammatoires favorisant la rupture de son intégrité. De plus, ce travail suggère également que la protéine NSs n'est pas impliquée directement dans la neuroinvasion, mais indirectement en participant à l'inhibition de la réponse immunitaire de la BHE et en facilitant ainsi la réplication du RVFV. De façon intéressante, ce travail a également démontré que cette réponse immunitaire est principalement médiée par les cellules endothéliales et qu'elle semble polarisée vers le compartiment sanguin.

En l'absence de NSs, il semble que l'exacerbation de la réponse immunitaire majore le recrutement de cellules immunitaires tels que les lymphocytes à la BHE infectée. En présence de NSs, ce recrutement n'est pas mis en place dans le modèle utilisé, suggérant une inhibition de la réponse immunitaire et l'absence de neuroinflammation en phase précoce de l'infection. De même, certains résultats préliminaires laissent à penser que ce recrutement est uniquement médié par l'inflammation de la BHE plutôt que par l'activation des cellules immunitaires. De plus, le rôle des cellules dendritiques dans un potentiel mécanisme de cheval de Troie a été exploré de façon préliminaire et suggère que ces cellules majeures dans les phases précoces de l'infection ne participent pas à la neuroinvasion par ce mécanisme, mais cela reste à confirmer. Ce travail est présenté dans la section suivante sous forme d'un article de recherche accepté dans le journal *Journal of Virology* (Article 2, données supplémentaires en Annexe 6), et au travers de présentations orales à plusieurs congrès scientifiques.

II. Article 2: Rift Valley fever virus is able to cross the human blood brain barrier *in vitro* by direct infection with no deleterious effect

Title: Rift Valley fever virus is able to cross the human blood-brain barrier *in vitro* by direct infection with no deleterious effects

Running title: Rift Valley fever virus and the human blood-brain barrier

Jordan Quellec[1,2], Camille Piro-Megy[1], Marion Cannac[3], Sébastien Nisole[3], Florent H. Marty[2], Fabien Gosselet[4], Fumitaka Shimizu[5], Takashi Kanda[5], Catherine Cêtre-Sossah[1#±] and Sara Salinas[2#±]

[1] ASTRE, CIRAD, INRAE, University of Montpellier, Montpellier, France
[2] PCCEI, University of Montpellier, INSERM, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France
[3] IRIM, CNRS UMR9004, University of Montpellier, Montpellier, France
[4] Blood Brain Barrier Laboratory, Faculty of Science Jean Perrin, Artois University, UR 2465, Lens, France
[5] Department of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Ube, Japan

[#]Corresponding author catherine.cetre-sossah@cirad.fr and sara.salinas@inserm.fr
[±] These authors jointly supervised this work

Abstract: Rift Valley fever (RVF) is a zoonotic arboviral disease that cause recurrent epidemics in Africa that may trigger fatal neurological disorders. However, the mechanisms of neuroinvasion by which the RVF virus (RVFV) reaches the human central nervous system (CNS) remain poorly characterized. In particular, it is not clear how RVFV is able to cross the human blood brain barrier (hBBB) which is a neurovascular endothelium that protects the brain by regulating brain and blood exchanges. To explore these mechanisms, we used an *in vitro* hBBB model to mimic *in vivo* hBBB selectiveness and apicobasal polarity. Our results highlight the ability of RVFV to cross the hBBB by direct infection in a non-structural protein S (NSs)-independent but strain-dependent manner, leading to astrocyte and pericyte infection.

Interestingly, RVFV infection did not induce hBBB disruption and was associated with progressive elimination of infected cells with no impairment of the tight junction protein scaffold and barrier function. Our work also shows that NSs, a well described RVFV virulence factor, limited the establishment of the hBBB-induced innate immune response and subsequent lymphocyte recruitment. These results provide *in vitro* confirmation of the ability of RVFV to reach human CNS by direct infection of the hBBB without altering its barrier function, and provide new directions to explore human RVFV neurovirulence and neuroinvasion mechanisms.

Importance: The RVF virus (RVFV) is capable of infecting humans and inducing severe and fatal, neurological disorders. Neuropathogenesis and human central nervous system (CNS) invasion mechanisms of RVFV are still unknown with only historical studies of autopsy data from fatal human cases in the 1980s and exploration studies in rodent models. One of the gaps in understanding RVFV human pathogenesis is how RVFV is able to cross the blood-brain barrier (BBB) in order to reach the human CNS. For the first time, we show that RVFV is able to directly infect cells of the human BBB *in vitro* to release viral particles into the human CNS, a well characterized neuroinvasion mechanism of pathogens. Furthermore, we demonstrate strain-dependent variability of this neuroinvasion mechanism, identifying viral properties that could be explored to prevent neurological disorders during RVFV outbreaks.

Key words: Rift Valley fever virus, blood brain barrier, neuroinvasion, immune response, endothelium integrity

Introduction

The emergence of zoonotic viral infections in recent decades is linked to increased human activities, global warming and environmental changes (1, 2). It is therefore crucial to better understand emerging vector-borne viral diseases by improving our knowledge of arthropod-borne viruses (arbovirus) and host interactions (1). Neurological disorders triggered by neurotropic viruses have become a serious burden and highlight the need for both specific prevention strategies and efficient treatment (3–5). One of these viral diseases is Rift Valley fever (RVF), first described in Kenya in 1930, that is caused by the arbovirus Rift Valley fever virus (RVFV) (6). RVFV is a tripartite and negative single stranded RNA virus of the Bunyaviricetes class and belongs to *Phlebovirus riftense* species (7–9). RVFV has high dissemination capacity with reports of alarming, re-occurring and ongoing epidemics in endemic countries in Africa, the South West Indian Ocean region and the Arabian Peninsula (9–12). RVFV epidemics are a serious threat to both animal and human health (8, 9, 13). However, despite the increased risk of emergence of RVF at a global scale, there are still no commercially available vaccines or specific antiviral treatment for RVFV infection in humans (14). Consequently, RVFV is rated as Class A bioterrorism agent by US Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), and the World Health Organization (WHO) classified RVFV on the Blueprint list of "Pathogens prioritization" as a prototype pathogen with pandemic potential that representing a public health emergency of international concern.

Human pathogenesis of RVFV is still poorly understood with numerous questions remaining unanswered. RVFV is transmitted from infected livestock to humans either by direct

contact through aerosolized particles or via mosquito bites (9, 15, 16). The human mortality rate from RVFV infection ranges from 0.5% to 2% but has reached higher rates in some epidemics (9, 17, 18). Clinical manifestations of RVF in humans range from flu-like symptoms to less common but severe clinical manifestations associated with higher mortality (17–19). These severe manifestations take four main forms: acute hepatitis, hemorrhagic fever, ocular diseases and neurological disorders (17, 18). Poorly characterized in humans, neurological disorders have a variable prevalence (<1% to 21%) and are mainly characterized by a delayed-meningoencephalitis occurring from 1 to 4 weeks post-infection, with up to 50% mortality and potentially definitive neurological sequalae (17–19). Associated with severe neurological symptoms (*e.g.* convulsion, hallucination or coma), human brain damage is poorly described in the literature, but has been reported to involve tissue necrosis with lymphocyte and macrophage infiltration, lymphocytic pleocytosis in the cerebrospinal fluid and perivascular cuffing (16–18, 20–22).

RVFV neuropathogenesis has been studied using several rodent and non-human primate (NHP) models but the question of how RVFV is able to reach the central nervous system (CNS) remains unclear (17, 23–26). In rodents, it was recently demonstrated that after infection by aerosolization of viral particles, RVFV was able to reach the CNS by infection of the olfactory epithelium, across the cribriform plate that protects olfactory receptor neurons (27). CNS infection in rodents is characterized by (i) massive viral replication, (ii)late breakdown of the blood brain barrier (BBB) and (iii)late immune response associated with infiltration of leukocytes. Immune response and leukocytes are needed for viral clearance of RVFV, but may worsen damage to brain tissue associated with severe encephalitis (28–33). In NHP showing clinical signs of encephalitis after RVFV infection, infection of neurons in the brain was also confirmed by histological examinations of brain tissue, although neuroinvasion mechanisms were not explored (23). Like in animal models, the neuroinvasion mechanisms used by RVFV to reach the human CNS remain unknown (25, 26, 34).

Given the crucial roles the CNS plays in global homeostasis, it is immuno-privileged and isolated from physiological changes, toxins, and pathogens by the presence of several cell barriers, that regulate exchanges between the CNS and other compartments of the body (35–37). The neurovascular unit (NVU) is one of these barriers that regulate exchanges between the blood and the CNS (37). The NVU is a complex organization of different cell types: supporting cells (astrocytes, pericytes, microglia) help and regulate the neurovascular endothelium, more commonly named the blood-brain barrier (BBB) (36, 37). Human BBB (hBBB) is composed of specific endothelial cells, the human brain microvascular endothelial cells (hBMEC), forming a poorly permeable vascular endothelium with specific characteristics: (i) an apicobasal polarity associated with specific cell transporters able to regulate exchanges between the bloodstream and the brain and (ii) highly expressed specific tight junction (TJ) proteins between cells to ensure that the endothelium is poorly permeable and that paracellular spaces are sealed (35–38). One of these TJ proteins is the cytoplasmic TJ-associated Zonula occludens-1 (ZO-1), whose role is to organize transmembrane TJ proteins in an intercellular scaffold (35). Disruption of ZO-1 leads to breakdown of the BBB and neurological disorders (35). Pathogens may use different routes to reach the CNS and cross the BBB: (i) the axonal transport following infection of synapses or axons from peripheral nerve or from the olfactory tract, or (ii) the

haematogenous routes (39, 40). This last mechanism includes different ways of crossing the BBB from the blood compartment and of releasing viral particles into the CNS; these ways include direct BMEC infection, para- or transcellular diffusion or Trojan horse mechanism by infection of immune cells that are naturally able to transmigrate through the BBB (39, 40).

Mechanisms used by RVFV during viremia to cross the human BBB have not been characterized to date (26). To explore RVFV neuroinvasion mechanisms, we used an *in vitro* human BBB model composed of human endothelial cells (hEC) differentiated into human brain-like endothelial cells (hBLEC) after co-culture with human brain pericytes, thus mimicking blood (apical) and brain (basal) compartments, as well as *in vivo* hBBB selectiveness and specific markers (41–45). Using this model, we first characterized hBBB permissiveness and integrity following RVFV infection. We also examined at the role in RVFV neuroinvasion of RVFV non-structural protein NSs, a major virulence factor implicated in numerous viral mechanisms, and in particular, inhibition of cell immune response (46, 47). Finally, we explored the immune response induced by RVFV-infected hBBB and the role of astrocytes in hBBB disruption.

Results

RVFV differentially infects human cell types that make up the hBBB

To characterize RVFV neuroinvasion mechanisms, we decided to explore separately the permissiveness of each of the cell types composing a human BBB model previously described in literature (41, 44, 45). As a first approach, we explored the permissiveness of human endothelial cells (hEC) not yet differentiated into specific endothelial cells of the hBBB (hBLEC), and human brain pericytes.

Each cell type was infected at a multiplicity of infection (MOI) of 1 using two distinct RVFV strains (MRU25010-30 and Mayotte 2008). Viral infection was first assessed using an immunostaining approach: we observed the ability of the two RVFV strains to infect at 1 day post-infection (dpi) hEC (labeled specifically with the ZO-1 TJ marker) (Figure 1a) and pericytes (labeled specifically with the PDGFRβ marker) (Figure 1b). At 2 dpi, a significant difference in the quantification of infected cells was observed between the two cell types but not between the two RVFV strains for each cell type (Figure 1c). RVFV infection was estimated at 2 dpi at 0.8 +/- 0.4% and 7.9 +/- 5% for pericytes and hEC respectively, with similar rates for MRU25010-30 and Mayotte 2008. This difference was confirmed when RVFV titers were determined using the TCID50 method at several time points post-infection for both RVFV strains and for each cell type (Figure 1d). In hEC, MRU25010-30 and Mayotte 2008 RVFV strains displayed a significant replication up to 2 dpi. In accordance with the percentage of infected cells, there was no significant difference in titers between the two strains. In pericytes, MRU25010-30 and Mayotte 2008 displayed a significant replication up to 2 dpi, but, unlike in hEC, the two strains had different viral titers at 2 dpi (LM, p-value<0.05). Independently of the RVFV strain, there was a potent and significant difference between titers of each cell type at each time post-infection (*i.e.* from 1 to 3dpi).

These results revealed permissiveness of human endothelial cells and brain pericytes but significant variability in the cell type-dependent infection rate. Indeed, RVFV infected hEC more efficiently than pericytes. Moreover, RVFV showed strain-dependent variations in replication in pericytes but not in hEC.

RVFV is able to cross the human BBB by direct infection

Despite the description of neurological disorders related to RVFV human infections, the neuroinvasion mechanisms used by RVFV to reach the brain are still unknown. In order to study this mechanism as well as the impact of the cellular differentiation on the RVFV infection, we differentiated the hECs described before into BBB specific endothelial cells by co-cultivation with human brain pericytes. The hEC derived from CD34+ hematopoietic cells were then plated on the apical side of transwells and co-incubated with human brain pericytes that were plated on the other side of the transwell (basal side) 6 days before infection (Figure 2a), allowing further differentiation of the hEC in human brain-like endothelial cells (hBLEC).This *in vitro* human BBB model mimics the blood compartment (apical) and the brain parenchyma compartment (basal) of brain blood micro-vessels and display similar characteristics than *in vivo* hBBB (low permeability, specific markers, channels, tight junction proteins and selectiveness) (43–45). This *in vitro* model was extensively used in order to characterize CNS invasion mechanisms by several viruses (48–52).

The *in vitro* hBBB model was infected at a MOI of 1 on the apical side to mimic viremia during infection with both MRU25010-30 and Mayotte 2008 RVFV strains. The susceptibility of the two cell types that comprise mature hBBB (*i.e.* hBLEC and pericytes) was determined by immunostaining. Using this approach, we showed that each strain was able to infect hBLEC at 24hpi (Figure 2b), but pericytes only at 3dpi (Figure 2c), suggesting that infection of pericytes occurred following infection and crossing of the hBLEC monolayer by RVFV strains. Determination of the percentage of infected hBLEC showed a much lower percentage of infected cells than in hEC in monoculture conditions (Figure 2d). At early time post-infection (*i.e.* 16hpi), 4 +/- 1.5 % cells were infected by Mayotte 2008 and 1.6 +/- 0.7% cells were infected by MRU25010-30. This infection rate remained stable for MRU25010-30 at 2dpi but was lower for Mayotte 2008 (0.4 +/- 0.3 %).

Despite the lower percentage of RVFV-infected hBLEC compared to hEC, we showed an efficient replication of RVFV in hBLEC. RVFV titers, determined by the TCID50 method at different time points post-infection in both strains and in both compartments, reached similar titers as described in other types of cells known to be permissive to RVFV infection such as astrocytes and liver cell lines (Figure 2e) (47, 53). The RVFV strain MRU25010-30 showed a potent and significant replication at the apical side the first day post-infection and kept on replicating up to 3dpi. The RVFV strain Mayotte 2008 showed a weaker but nevertheless significant replication up to 2dpi. There was a significant difference between the titers of the two strains at 1 and 3dpi, but this difference was no longer significant at 7dpi. (Figure 2e). Significantly, the RVFV strain MRU25010-30 crossed from apical to basal compartments during the first 24hpi, whereas the RVFV strain Mayotte 2008 crossed from the apical to the basal side later, only detected on 2dpi and kept on increasing until 7dpi, in line with its lower apical replication. In the basal compartment, there was a significant difference between the two

RVFV strain titers between 1dpi and 3dpi but this difference was no longer significant at 7dpi (Figure 2e).

These results highlighted the ability of RVFV to infect hBLEC and cross the BBB, illustrated by efficient RVFV replication, consistent with a mechanism of neuroinvasion through direct infection of the hBBB. Independently of the RVFV strain, there was a significant correlation between apical and basal titers (Spearman test, r=0.841, p-value<0.0001, n=90/N=3) as well as between the increase in the apical titers and in the basal titers up to 3dpi (Pearson test, r=0.707, p-value<0.05, n=8/N=3). These correlations suggest a crucial role of RVFV replication for neuroinvasion. However, viral kinetics during hBBB infection and neuroinvasion *in vitro* seemed to be strain-dependent.

Maintenance of hBBB integrity during RVFV infection

After assessing hBBB permissiveness to RVFV infection, we explored the impact of RVFV infection on hBBB integrity and barrier function, since RVFV is a well-characterized lytic virus. To this end, we infected the human *in vitro* BBB model at a MOI of 1 with the two RVFV strains MRU25010-30 and Mayotte 2008 and at 2dpi, performed immunostaining of TJ protein ZO-1 on large fields of the hBBB in RVFV and mock-infection conditions (Figure 3a). First, we observed the maintenance of tight junction protein scaffolds, more specifically through the location of the TJ protein ZO-1 in the cell membrane, which is widely considered to be a crucial determinant of BBB maintenance (35). Independently of the RVFV strain, this qualitative approach demonstrated that RVFV infection of hBLEC did not alter ZO-1 expression or location compared to mock conditions. More precisely, RVFV-infected cells expressed ZO-1 at cell junctions, suggesting that infected cells were still associated with intact TJs at this stage and that RVFV infection of hBLEC did not lead to hBBB disruption. To go further, we quantified the expression of mRNA encoding several TJ proteins in hBLEC infected with RVFV for 48h by RT-qPCR (Figure 3b). Consistent with our previous observations, we did not detect any upregulation (fold-change >2) or downregulation (fold-change <-2) in RVFV-infected hBLEC of the three TJ protein transcripts tested: Claudin-5 (*CLDN5*), Occludin (*OCLN*) and ZO-1 (*TJP1*). This result suggests that RVFV infection had no effect on TJ gene expression. To further confirm this observation, we quantified transcellular hBBB permeability at different time points during infection. To this end, we used a Lucifer Yellow assay to determine a coefficient of permeability (Pe) (Figure 3c). As described in the literature, a Pe $<1\times10^{-3}$ cm/min corresponds to an impermeable or "tight" BBB (43, 54). Compared to mock-treated hBBB, each strain did not induce significant impairment of hBBB permeability at each time point analyzed, not even at 7dpi.

Taken together, these results suggest that RVFV is able to cross the human BBB by direct hBLEC infection without disrupting TJ scaffolds and with no deleterious effects on hBBB barrier integrity.

Infection of hBBB by RVFV leads to the elimination of infected cells from the hBLEC monolayer.

Because of the low percentage of RVFV-infected hBLEC compared to hEC and the maintenance of hBBB integrity despite RVFV infection, we decided to explore the fate of infected cells. Using immunostaining, we observed gradual elimination of RVFV-infected cells from the hBLEC monolayer (Figure 4a). Infected hBLEC became progressively rounder and higher on the Z-axis compared to adjacent uninfected cells. We observed that higher cells were smaller and their expression of ZO-1 decreased (Figure 4b). Nevertheless, despite infection, cells kept expressing ZO-1, corroborating our previous results. We confirmed this observation by 3D quantitative microscopy after labelling cells with anti-GAPDH (cell cytoplasm staining), anti-RVFV and anti-ZO1 antibodies. Indeed, by measuring the height on the Z-axis (|DeltaZ|), RVFV fluorescence (RVFV intensity ratio, Figure 4c) and cell volume for RVFV- and mock-infected cells, we first showed that RVFV-infected cells were significantly higher than mock-infected cells (Figure 4d). We highlighted a significant and positive correlation between cell height and RVFV fluorescence (Spearman test, r=0.217, n=126/N=4, p-value=0.0144) (Figure 4e). Our data confirmed a significant and negative correlation between RVFV fluorescence and cell volume (Spearman test, r=-0.234, n=126 N=4, p-value<0.01), as well as between the volume of infected cells and their height (Spearman test, r=-0.321, n=52/N=4, p-value<0.01). To assess whether RVFV hBLEC infection led to cell mortality, we measured LDH activity, a well-known cytoplasmic enzyme marker of cytotoxicity, in apical supernatants at several time points post infection. Using this approach, we showed that the percentage of cytotoxicity became significantly higher from 3dpi in RVFV-infected conditions compared to mock-infected hBLEC (figure 4f).

Although these results suggest that hBLEC RVFV infection leads to moderate cell mortality, it seems that the hBBB maintains its integrity during RVFV infection by gradually eliminating infected cells from the monolayer without disrupting cell junctions, thereby corroborating maintenance of the endothelium during infection.

Cell-dependent and polarized modulation of the RVFV-induced immune response by hBBB

As mentioned above, we observed that RVFV infection at the apical side reached a plateau at 3dpi, suggesting control of viral replication by the hBBB. To test this hypothesis, we explored the hBBB innate immune response induced by RVFV infection with MRU25010-30 and Mayotte 2008 at MOI of 1. We measured mRNA expression of different genes implicated in the modulation of the innate immune response and cell viability in hBLEC and human pericytes. At 48hpi, the mRNA extracted from each type of cell was quantified by RTqPCR (Figure 5a). Only hBLEC mRNA showed moderate upregulation of several genes implicated in the innate immune response: type I interferon (*IFNB*, *ISG15*) and inflammatory response (*CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *TNFA*). However, we did not observe any upregulation of IFNA or gene involved in the type II interferon response (*IFNG*). Confirming published work on BBB antiviral activity (55), we observed an upregulation of mRNA encoding type III interferons (*IFNL1*, *IFNL2/3*) for both strains. Consistent with our previous results, there was no change in expression of apoptosis-associated genes (*CASP3*, *CASP9*) or of genes implicated in the disruption of the BBB structure such as matrix metalloproteases (*MMP: MMP2/MMP9*). Moreover, we detected no significant changes in the expression of selected genes in pericytes

(at the basal side of the hBBB) at 2dpi. There was a significant difference in gene expression between the two RVFV strains in hBLEC: only MRU25010-30 induced upregulation of IL6 mRNA expression, and a significantly greater increase in *IFNL1* and *CXCL10* expression (p-value<0.05). To confirm the absence of innate immune response in pericytes upon RVFV infection of the hBBB, we repeated the experiment at 1 dpi on monocultures (Figure 5b). Only weak upregulation of *IFNL1* mRNA expression was observed after infection of pericytes by both RVFV strains. In addition, *IFNA2* and *IFNB* were upregulated only when cells were infected by the RVFV MRU25010-30 strain. Finally, there was no upregulation of *ISG15*, suggesting that IFN response was not triggered.

Because of the role of RVFV NSs protein in the inhibition of mRNA nuclear export, we also explored the immune response induced by RVFV infection at the protein level. We observed significant upregulation in the apical compartment of some cytokines and chemokines, including proteins upregulated at the mRNA level, *e.g.* CCL5, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 (Figure 5c). However, at 2dpi, we did not detect any significant upregulation of IFN-β1 or IFN-λ1 at the protein level, despite the upregulation at the mRNA level. Nevertheless, the upregulation of CXCL10 (at the protein level) or ISG15 mRNA, both of which are induced by type I interferon, indirectly demonstrated the efficient establishment of the IFN response upon infection. Interestingly, there was no significant strain-dependent difference in the upregulation at the protein level, suggesting that despite a different level of mRNA upregulation, immune response was induced at the same level in the two RVFV strains. We did not detect any change at the protein level in the basal compartment, thereby confirming the absence of innate immune response elicited by pericytes at the basal side at 48hpi. We further investigated this absence in monoculture pericytes infected with RVFV and observed no significant modulation of cytokine and chemokine expression (Figure 5d).

These results demonstrated a moderately polarized strain-dependent innate immune response on the apical side of the hBBB, mediated solely by hBLEC.

Neuroinvasion of RVFV is NSs-independent, although NSs is required for the control of RVFV-induced hBBB immune response

To explore the potential role of the major RVFV virulence factor NSs in neuroinvasion mechanisms, and notably in hBBB infection and crossing, we used the Clone 13 RVFV strain, a naturally NSs-deleted strain (56). We infected the *in vitro* human hBBB model on the apical side with a MOI of 1 and quantified the viral titers at several post-infection time points (Figure 6a). Interestingly, Clone 13 was able to infect hBLEC, had a significant replication and crossed the hBLEC monolayer in the first 24hpi, as illustrated by a significant increase in viral titers in the apical and basal compartments. Unlike other strains, replication of Clone 13 appeared to be controlled after 1dpi as there was no significant difference between titers at day 1, 2 or 3 post-infection, in both basal and apical compartments. Despite the lack of a major virulence factor, Clone 13 replicated more efficiently than Mayotte 2008 and as efficiently as the most virulent strain, MRU25010-30. Indeed, at 1dpi, there was a significant difference between viral titers of Clone 13 and Mayotte 2008, but no difference between Clone 13 and MRU25010-30. Moreover, in the same way as with MRU25010-30 and Mayotte 2008 RVFV strains, infection of hBLECs with Clone 13 did not disrupt hBBB integrity (Figure 6b). To understand why clone

13 replication reached a plateau as early as 1dpi, we evaluated hBBB innate immune response at 2dpi at the protein level (Figure 6c). We showed that Clone 13 induced a stronger inflammation than MRU25010-30 and Mayotte 2008, potentially inhibiting Clone 13 replication. Only Clone 13 induced upregulation of CCL2 expression in the apical compartment, as well as stronger and significant upregulation of CCL5, CXCL9, CXCL10 and CXCL11 than MRU25010-30 and Mayotte 2008 (Kruskal-Wallis test, p-value<0.05). Moreover, only Clone 13 induced upregulation of these cytokines in the basal compartment. Thus, it seems that the lack of NSs induced a stronger innate immune response, and unlike virulent viruses, in both compartments. To go further, we explored the role of this innate immune response in leukocyte recruitment at the hBBB, which is an important feature of neuroinflammation during RVFV encephalitis (29). To do so, we co-incubated harvested apical supernatant of 2dpi RVFV- or mock-infected hBBB with human primary lymphocytes overnight, and then co-incubated the lymphocytes with the corresponding RVFV- or mock-infected hBBB. After 45min of co-incubation, the cells were washed and the number of adherent lymphocytes was quantified (Figure 6d/e). Using this experimental approach, we were able to show that RVFV infection increased lymphocyte adhesion to the hBBB by a factor of 2, but only in the case of the NSs-delated strain Clone 13.

Taken together, these results suggest that RVFV NSs virulence factor is not crucial for neuroinvasion by direct infection, but produces a stronger innate immune response, limiting RVFV replication and potentially enhancing neuroinflammation (cytokine/chemokine expression and leukocyte recruitment). Thus, by limiting the establishment of the innate immune response, NSs might be necessary for efficient replication of RVFV in the brain after crossing the hBBB.

Infection of hBBB triggers human astrocyte infection but without disrupting BBB integrity

Regulation of BBB integrity is mediated *in vivo* by a complex interplay of NVU cells, in particular by human astrocytes, major CNS glial cells that have already been described as permissive to RVFV infection *in vitro* (47). To explore whether RVFV crossing the hBBB can infect astrocytes and whether the infection can then lead to hBBB disruption, we used an *in vitro* triculture hBBB model with the same culture conditions and viral infection as the previous coculture hBBB model. (Figure 7a) (41, 57). After 6 days of co-culture, hBBB transwells were transferred on 12-well plates containing human primary astrocytes. To explore whether RVFV can cross hBBB and infect human astrocytes in the compartment at the bottom of the 12-well plates, we performed apical infection of hBLEC at MOI of 1 with RVFV strains MRU25010-30 and Mayotte 2008. Additionally, to directly explore whether RVFV infection of astrocytes can lead to hBBB disruption, we performed basal infection of astrocytes at MOI of 0.1. As expected, basal infection of astrocytes led to a stronger infection of these cells: at 6dpi and compared to mock and apical infections of hBLEC, MRU25010-30 and Mayotte 2008 appeared to induce a stronger cell toxicity (Figure 7b). Compared to other conditions, only basal RVFV infection at 6dpi induced cell shrinkage and rounding. This observation was confirmed by quantifying viral RNA by RT-qPCR in infected astrocytes (Figure 7c), when the amount of viral RNA was indeed significantly higher in astrocytes directly infected in the basal

compartment at 3dpi. Moreover, the peak of infection (approximatively 10^7 Eq. TCID50/mL) was reached at 3dpi for astrocytes infected directly in the basal compartment, and there was no significant difference in viral RNA quantification in the two strains between 3 and 6dpi. However, following apical infection of hBLEC, infected astrocytes in hBBB triculture showed a significant increase in viral quantification in both strains between 3 and 6dpi: MRU25010-30 increased from $10^{2.9}$ to $10^{6.1}$ Eq. TCID50/mL and Mayotte 2008 increased from $10^{1.2}$ to $10^{6.4}$ Eq. TCID50/mL. This delay at 3dpi between the two routes of infection suggests that RVFV reached astrocytes later when infection is carried out on the apical side of hBLEC. At 6dpi, there was no longer any significant difference between viral quantification of the two strains or between the two types of infection. These results suggest that infection of astrocytes occurred after infection and crossing of the hBBB by RVFV. Analysis of hBBB integrity by calculating the Pe coefficient showed that despite apical infection of hBLEC or direct basal infection of astrocytes, there was no disruption of RVFV-infected triculture hBBB compared to mock-infected triculture hBBB (Figured 7c). To explore whether inflammatory signals in hBBB triculture can be modulated by the presence of astrocytes, we quantified several cytokines implicated in the inflammatory response at the protein level at 6dpi in each strain and with each type of infection (Figure 7e). Following the apical infection of hBLEC with both RVFV strains, we observed upregulation of 3 inflammatory cytokines, *i.e.* CCL5, CXCL9 and CXCL10, in the apical compartment. In contrast to the astrocyte-free hBBB culture, we also observed moderate upregulation of CXCL9 and CXCL10 in the basal compartment at 2dpi. In comparison, when astrocytes were directly infected in the basal compartment, we observed weaker upregulation of the CCL5, CXCL9, and CXCL10 cytokines. CXCL10 was upregulated in the basal compartment in both strains, but only MRU25010-30 induced the upregulation of CXCL9 expression. There was only weak upregulation of CXCL9 in the apical compartment, and no longer any upregulation of CXCL10 and CCL5. These results suggest that only direct infection of hBLEC can induce moderate hBBB inflammation. Moreover, it seems that infection of astrocytes alone did not lead to hBBB inflammation on the apical side by secretion of immune mediators.

Together, these results show that potent infection of astrocytes occured after viral crossing of the hBBB, but suggest that astrocyte infection did not lead to the secretion of immune mediators that could trigger hBBB disruption or inflammation. Thus, inflammation of hBBB seems to be induced only by direct infection of hBLEC by RVFV.

Discussion

For the first time to our knowledge, our results show that RVFV is able to cross the human BBB *in vitro* by direct infection in a NSs-independent manner but following strain-dependent kinetics. Crossing led to the infection of pericytes and astrocytes in the compartment that mimics brain parenchyma. However, in our model, infection of hBLEC, pericytes or astrocytes did not disrupt BBB, possibly due to gradual elimination of infected cells from endothelial monolayer with potential maintenance of TJ scaffolds. Our work also highlighted the restriction of hBBB-induced innate immune response by NSs in the apical compartment, thereby potentially favoring RVFV replication.

Interestingly, our work showed that NVU cell types had different permissiveness profiles: hEC and hBLEC are highly permissive, allowing more potent RVFV replication than pericytes. What is moreover, only hBLEC triggered an immune response against RVFV whereas the immune response of pericytes was not at all or only poorly elicited. Surprisingly, pericytes are described in the literature as brain cells mediating inflammation in the CNS by secreting several cytokines including CCL5 or CXCL10, and it will now be interesting to determine which viral factor inhibits pericyte immune response during RVFV infection (58). Moreover, it appeared that pericytes are more resistant than hBLEC to RVFV infection and it will now also be interesting to explore which cell factors influence this resistance (cell receptor, cellular machinery, basement membrane). These cellular factors are probably not correlated with the immune response since pericytes are able to resist without establishment of an immune response, suggesting resistance to RVFV infection is intrinsic.

We observed no damage to hBLEC monolayers following RVFV infection, however we only undertook these observations at relatively early time points post infection. Rupture of the human BBB could be a later event, as has been reported for human neuropathology, and should consequently be explored (17). Nevertheless, our description of the absence of early BBB breakdown in our *in vitro* model seems to be in agreement with reported observations. Indeed, neurovascular leakage and cerebral hemorrhages are rarely described in humans manifesting RVFV neurological forms and are mainly related to hepatic failure (4, 16, 21), suggesting that the neurovascular system is not strongly impaired during RVFV infection. In addition, RVFV infection of hBLEC did not lead to secretion of factors that favor BBB disruption upon RVFV infection, such as MMPs or inflammatory cytokines (IL-1β, IL6, TNFα) as has been observed with other neurotropic viruses such as the West Nile virus (WNV) (39, 51, 59). Moreover, we observed upregulation of the IFN-λ response during RVFV infection, a type III interferon response mainly upregulated by epithelium or endothelium, and described to be able to limit viral replication and tighten the BBB (55). In addition, RVFV-infected cells were eliminated from the cell monolayer without disruption of TJ scaffolds, suggesting that natural mechanisms of BBB cell renewal would allow this elimination without disruption of the barrier function. Indeed, it has been reported that apoptotic bovine BMEC continue to express ZO-1 during apoptosis, but BMEC renewal is rarely described in the literature (60). In comparison, the elimination of intestinal epithelial cells during cell renewal, known as cell extrusion, is a much better described mechanism: extruding cells maintain cell-cell contact with surrounding cells by remodelling TJ scaffolds, such as ZO-1, to keep sealing the paracellular space and thus maintain barrier integrity during this process (61). Our results seem to identify a similar mechanism for RVFV-infected hBLEC extrusion from hBBB and it would be interesting to explore this mechanism further in the context of other viral infections.

In addition, BBB function *in vivo* is regulated by a large and complex cell organization. It will be necessary to explore and mimic the NVU more precisely to see whether some types of cells can induce BBB breakdown during RVFV neuroinfection. Here, we showed that RVFV infection of astrocytes did not cause BBB disruption. However, our model did not allow us to mimic the complete interaction between astrocytes and BBB, *i.e.* protein signals and physical connection between BBB and the end-foot of astrocytes (37, 62, 63). It would be interesting to use a model that allows this connection in order to evaluate if astrocyte mortality, already

described during RVFV infection, induces disruption of this connection and thus disruption of BBB integrity (47). However, our results at this stage suggest that RVFV can replicate in the CNS by infection of glial cells without disrupting hBBB, at least at early stages, which is consistent with descriptions of delayed-onset encephalitis in human cases during RVFV infection.

Our investigation showed the establishment of a moderate innate immune response only by hBLEC after RVFV infection, which is polarized to the apical or blood compartment. Interestingly, and despite their described role in immune modulation, astrocyte infection did not lead to an inflammation of hBBB. It is possible that the absence of hBBB inflammation is related to the inhibition of astrocyte innate immune response by the viral protein NSs, as previously reported in the literature (46, 47). Similarly, the RFVF-induced innate immune response in hBLEC is limited by NSs, since infection by the NSs-deleted strain Clone 13 triggered a more potent response. Furthermore, only Clone 13 induced the attachment of lymphocytes at the hBBB at 2dpi. Indeed, we demonstrated higher upregulation of the chemokines CCL5 and CXCL10 in Clone 13-infected hBLEC supernatants, which are described as factors involved in lymphocyte recruitment at the BBB (39, 64).It has been reported in rodents and in human post-mortem analyses that severe encephalitis was associated with neuro-vasculitis, lymphocytic perivascular cuffing, lymphocytic infiltration on the CNS as well as in the CSF (16, 20–22, 29). We showed that the lack of NSs induces earlier and higher upregulation of innate immune response, although it is possible that in the case of virulent strains, the recruitment of lymphocyte at the BBB occurs at a later stage of infection. Nevertheless, it seems that a strong or dysregulated innate immune response against RVFV at the hBBB is responsible for this recruitment and can enhance neuroinflammation, corroborating the description of severe cases when immune response is dysregulated, and notably upregulation of pro-inflammatory chemokines such as CXCL10 (28, 65).

Interestingly, we found strain-dependent variation in neuroinvasion. Indeed, the strain MRU25010-30, which has already been already described as being more virulent than Mayotte 2008 (47), replicated earlier and at higher rates in hBLEC, leading to an earlier release from the basolateral side of the hBBB. However, we showed that the NSs-deleted Clone 13 strain can replicate at the same level as MRU25010-30. These results suggest that the variation in neuroinvasion by the different viral strains is not mediated by the NSs virulence factor, but by other RVFV factors. Moreover, we showed that hEC did not display this strain variability, suggesting that variability can also be mediated by cell factors or characteristics acquired by hBLEC after differentiation by co-incubation with pericytes. These results suggest that the susceptibility of the neurovascular system to RVFV infection can differ from that of peripheral blood vessels, corroborating triggering of hemorrhagic syndrome in peripheral vascular system but not in the human CNS (4, 17). In addition, it would be interesting to identify the virulence factors that drive the ability of RVFV to cross the hBBB and potentially induce neurological disorders. Indeed, during epidemics, it would be important to predict and prevent severe human encephalitis by assessing neuroinvasion ability based on the strain sequences, as is the case for other arboviruses such as *Flaviviridae* whose genetic mutations on the envelope glycoprotein can affect neurotropism (66). In this context, the virulent strain MUR25010-30 was reported to

induce severe and even fatal encephalitis in humans during the Mauritanian epidemic in 2010, whereas no encephalitis was reported in Mayotte in 2008 (67, 68).

We demonstrated the potential ability of RVFV to reach the CNS by directly infecting the BBB, but given the complex cellular organisation of the CNS, it seems important to confirm this conclusion by using more complex cellular models such as assembloids or through post-mortem histological analysis (69). Histopathological analysis of brains of patients who died of RVFV encephalitis are rare meaning the effective replication of RVFV in the human brain is still uncertain. Nevertheless, such replication was confirmed in NHP who displayed a neurological form similar to humans (23). It will be interesting to see if RVFV can use other routes to reach human CNS as several arboviruses have several neuroinvasion mechanisms, including the West-Nile virus (WNV) which reaches the CNS not only by direct infection, but also via the Trojan horse mechanism, by transcytosis across the BBB and also by axonal transport (40, 51). In mouse models, RVFV has been reported to be able to infect neurons, suggesting it can use axonal transport (24). Interestingly, the main route of transmission of RVFV to humans is through aerosolization of viral particles and it will be interesting to see if the human cribriform plate is also a possible entry route of RVFV into the CNS (27). Concerning the Trojan horse mechanism, its has been reported that dendritic cells are the main target of RVFV during the early stage of infection and could act as Trojan Horse as it is reported for other arboviruses (33, 39, 40, 70).

Taken together, our data highlight potential mechanisms of interaction between the CNS and RVFV in humans. Indeed, we have shown that RVFV can reach the human brain by crossing the BBB during the period of viremia, thereby potentially triggering neurological disorder through glial cells such as astrocytes (47). We highlighted strain variability, suggesting that several factors may influence the ability of RVFV to reach the brain and cause neurological disorders, which is consistent with the inter-individual and inter-epidemics variability in fatality cases and neurological prevalence. Thus, it is vital to explore both the host and the viral factors that lead to severe encephalitis in humans to improve public health prevention and treatment during RVFV epidemics.

Materials and Methods

Virus stock and quantification

Independent stocks of two RVFV virulent strains isolated in the field, strain MRU25010-30 (P1, Mauritania, 2010, KM210508) (71) and strain Mayotte 2008/00099 (P1, Mayotte, 2008, HE687302-HE687304) (67, 72), as well as the naturally NSs-deleted strain Clone 13 (P3, Bangui) (56), a kind gift from Dr M. Bouloy (Institut Pasteur, Paris), were produced using African green monkey kidney Vero cells (ATCC). Virus-containing medium was harvested when the cytopathic effect exceeded 75% and used as virus stock. If the strain is not specified and only RVFV is mentioned, the two virulent strains were used independently and the results of assays were merged to break free from strain-dependent variability. For each virus stock and each experiment, viral titers expressed in TCID50/mL from infected and mock supernatant were determined using the limiting dilution TCID50 method (Tissue Culture Infectious Dose, 50%) on Vero cells and the Spearman-Kärber method for the calculations (73).

When indicated, viral titers were also determined by RVFV specific one-step RTqPCR using the AgPath-ID One Step RTqPCR kit (Applied Biosystems, USA) on a LightCycler 96 (Roche, Switzerland) (Tables S1/S2). When measured by RTqPCR, viral titers are expressed in equivalent TCID50/mL (Eq. TCID50/mL) based on the standard curve established between Ct values and TCID50/mL values (Figure S1).

Cell monoculture and RVFV infection

African green monkey kidney Vero cells were grown in MEM medium supplemented with 2mM L-glutamine (Minimal Essential Medium, Gibco, USA) and 10% decomplemented fetal bovine serum (FBS) (Corning, USA) (Passage (P) 24-49). Human immortalized brain pericytes provided by Yamaguchi University Graduate School of Medicine (Japan) were maintained in flasks or on plates coated with 0.2% gelatin from porcine skin (Sigma, USA) in DMEM High-Glucose (Dulbecco Minimal Essential Medium, PAN-Biotech, Germany) complemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin (P12) (74). Briefly, pericytes were isolated from a patient who had suddenly died from a heart attack by using a cloning cap on dissociated cerebral cortex (74). Thereafter, cells were immortalized via sequential transduction with retrovirus-incorporated tsA58 and hTERT genes as described (74). Brain pericyte phenotype of these cells was performed by studying specific markers (α-smooth muscle actin, PDGFR-β, Desmin) (57). CD34+ human umbilical blood cord-derived endothelial cells (hEC) were isolated from umbilical cord blood, and purified as described previously (75). Briefly, cells were isolated by Ficoll density gradient and then positively selected twice using the mini-MACS immunomagnetic separation system (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Cells were subsequently cultured in EGM-2 medium (Lonza) supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum and 50 ng/mL of VEGF165 (PeproTech Inc.), on 1% gelatin-coated plates. After 15–20 days, hECs are seen in the culture dish. Morphological observations and positive endothelial markers detection (vWF, KDR, CD31) were used to confirm the endothelial phenotype of the cells (hECs). hEC were then cultured in flasks coated with 0.2% gelatin from porcine skin in endothelial cell growth medium MV2 (Promocell, Germany) supplemented with 0.5% gentamycin. Commercial human primary astrocytes were isolated from human brain and cryopreserved at passage one after confirmation by immunostaining of GAPDH (ScienCell, HA, 1800, lot 25672, USA). Astrocytes were maintained in flasks or on plates coated with 0.01% Poly-D-Lysine (Gibco, USA) according to the manufacturer's instructions (P3). All cells were grown at 37°C-5% CO_2. For RVFV infection and depending on the MOI, inocula were prepared by diluting viruses from viral stocks in the appropriate culture medium and were to the cells for a period of 90min. A mock control corresponding to the inoculum only containing medium was included for each infection. At the indicated time point post-infection, supernatants and cells were harvested and stored at -80°C.

Human-BBB and BBB triculture model

The human BBB model consists to co-cultivate the hEC obtained previously with immortalized human brain pericytes for 6 days on transwells (Costar, 0.4µm, USA) at 37°C-5% CO_2 (45). Cells were grown in endothelial cell growth medium MV2 (Promocell, Germany) with hEC on the upper side of the transwell coated with Matrigel (Corning, USA) and pericytes

on the bottom of the transwell coated with 0.2% gelatin. Co-incubation leads to differentiation of hEC into human brain-like endothelial cells (hBLEC) and mimics the main features of human brain-microvasculature endothelial cells (hBMEC) of the BBB (41–43). During differentiation, the medium was changed every 2 days. Lucifer Yellow assay (50 µM; Life Technologies, USA) was used to confirm hEC differentiation into hBLEC and to test endothelial permeability (Pe) by measuring and calculating passive diffusion of Lucifer Yellow molecule from the apical to the basal side as described in the literature using the EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer, USA, 432/538nm) (41, 42, 45). The BBB was considered tight/impermeable if Pe ≤ to 1×10^{-3} cm/min and disrupted if Pe > 1×10^{-3} cm/min (43, 54). Our BBB triculture model was adapted from the triculture model set up by Artois University (France): astrocytes were plated in 12-well plates in Endothelial Cell Growth Medium MV2 and *in vitro* differentiated human BBB model was added to the wells containing astrocytes (57). In the BBB and BBB triculture models, infection was performed as described above only if Pe were ≤ 1×10^{-3} cm/min, and if not specified, inocula were added on the apical side of transwells.

Indirect immunofluorescence assays

Monolayers of cells were infected on 12-well plates containing coverslips with appropriate coating in the case of monoculture or were infected on the top side of the transwell. Cells were fixed using a 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich, USA) solution for 20min at room temperature (RT) and then stored at 4°C. Cells were permeabilized (for 5min with Triton X-100 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) and saturated (for 30min in PBS 1X (Sigma-Aldrich, USA), 10% FBS (Sigma-Aldrich, USA) and 2% BSA (Sigma-Aldrich, USA)) before being labeled with primary antibodies for 90min at RT and then by secondary antibodies for 1h at RT (Table 1. Labeled coverslips or membranes of transwell were mounted on glass slides with mounting medium (Fluoroshield, Sigma-Aldrich, USA), imaged by inversed confocal ZEISS LSM 900 (Zeiss, Germany) and analyzed with Image J Software bundled with 64-bit Java 1.8.0_322. Infected cells were quantified by counting ≥ 500 cells per sample on aleatory panoramas of fields acquired with tiles modules. When relevant, quantitative cell parameters (volume, Z-axis height) were determined using anti-GAPDH staining, and RVFV intensity ratios were calculated by dividing the mean of RVFV fluorescence intensity of each cell by its volume. Quantitative values were obtained from confocal microscopy images using Imaris Software 10.0.0 (62757) with Imaris cells module 10.0.

Gene expression analysis

To explore the immune response induced by RVFV in hBLEC and pericytes, total RNA from cell monolayers was extracted according to the manufacturer's instructions (RNeasy mini kit, Qiagen, USA) and treated for genomic DNA elimination using RNase-free DNase Set (Qiagen, USA). The quality and the concentration of the total RNA extracted from each sample was checked using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Expression of genes involved in the immune response was then screened by a two-step RT-qPCR (RevertAid First Strand cDNA synthesis, ThermoScientific/LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche) with specific primers for each gene using 400ng of total RNA on LightCycler 480 equipment (Roche, Switzerland) (Tables S3/S4). Ct values of targeted genes were normalized using the housekeeping gene HPRT1. Fold-change values of transcripts compared to those of uninfected

condition were determined using the published 2-ΔΔCt method (76). If fold-change value X were <1, X were converted with -1/X.

Cytokine and chemokine quantification

To explore the immune response induced by RVFV in hBLEC and pericytes at the protein level, harvested supernatants were tested using 2 types of LEGENDPlex kits (Biolegend, USA) according to the manufacturer's instructions. Fluorescent signals (APC, PE) were measured with flow cytometer Canto II (BD Biosciences, USA) and data were analyzed using the online Biolegend software (LEGENDplexTM Data Analysis). For proteins whose concentration was above limit of detection for at least one condition, any modification of protein expression levels is expressed as the ratio of mean protein concentration in infected conditions to that in mock conditions. If protein ratio X was under 1, the value was expressed after -1/X conversion. Upregulation or downregulation of protein expression compared to mock conditions was arbitrarily considered to be above 1.5 or under -1.5, respectively, and confirmed statistically (47).

LDH Assay

To evaluate the cytotoxicity of the infection on hBLEC, LDH activity in apical supernatant of RVFV- or mock-infected hBBB were analyzed at different time points with the LDH CyQUANT Kit (ThermoFischer, USA) on Multiskan MS spectrophotometer (Thermo Labsystems, USA, 492nm/620nm) according to the manufacturer's instructions with slight modifications. Briefly, same replicates were measured at different time points by harvesting 50µL of apical supernatant and Maximum LDH activity was measured with independent samples at each time point after incubation with lysis buffer. Spontaneous LDH activity of hBLEC was determined by calculating the mean of the mock-infected sample per experiment and percentage of cytotoxicity was determined according to the manufacturer's equation:

$$\%\, Cytotoxicity = \left(\frac{Sample\ LDH\ activity - Spontaneous\ LDH\ activity}{Maximul\ LDH\ activity - Spontaneous\ LDH\ activity}\right) \times 100$$

Lymphocyte Adhesion Assay

Human primary cells were isolated from the buffy coats of healthy donors obtained from the Etablissement Français du Sang. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density centrifugation using Lymphoprep medium (STEMCELL Technologies, Canada). Primary cells were then cultured in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) complemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C-5% CO_2. Non-adherent peripheral blood lymphocytes were collected and grown in culture medium supplemented with 1µg/mL Phytohemagglutinin (PHA, Thermo Fischer Scientific, USA) for 24h, and then in culture medium supplemented with 10ng/mL rhIL-2 (ImmunoTools, Germany) for one week. T cell isolation was estimated by specific surface staining achieved with antibodies anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (OKT4), anti-CD14 (HCD14) (Biolegend, USA) and anti-CD8 (REA734, Miltenyi Biotec, Germany). Stained cells were analyzed with LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, USA) (Figure S2). T cells were then co-incubated overnight in harvested supernatant of 2dpi RVFV- or mock-infected BBB. After co-incubation, T cells were labelled

with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) according to the manufacturer's instructions (CellTrace CFSE Proliferation Kit, 492/517nm, Invitrogen, USA) and then added on corresponding RVFV- or mock-infected hBLEC for 45min, as described in the literature (51). After binding, the cells were washed with PBS 1X and an indirect immunofluorescence assay was performed as described above. After labeling, lymphocytes were counted based on a minimum of 2 random panoramas of 20 fields per sample.

Statistical analysis

Each infection was performed in triplicate for each condition. Each experiment corresponds to at least two independent infections. Depending on data distribution (Shapiro test) and on the type of assay, Model (GLM, LM), ANOVAs/Kruskal-Wallis, Student's t test/Mann-Whitney test or Spearman/Pearson correlation (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001) were used to analyze data with GraphPad Prism 10.2.3 (403) software or RStudio 2021.09.0 (351) (Package lme4 1.1-32, emmeans 1.10.00). When relevant, the sample sizes (n) and the number of independent experiments (N) are indicated in the figure and the statistical methods are named in the figure legends.

Data availability

All data concerning RNA expression assay are available in Tables S3/S4.

Ethics approval

Human cells were isolated as described below. The *in vitro* human BBB model requires the use of human cells obtained from donors. For the CD34+ hematopoietic stem cells, written informed consent was obtained from the family of the participant before enrollment in the study. The collection of human umbilical cord blood requires that infants' parents have signed consent forms in compliance with French legislation. The protocol was approved by the French Ministry of Higher Education and Research (CODECOH, Number DC2011-1321). All experiments were carried out in accordance with the approved protocol. Human brain pericytes were isolated from a patient who died suddenly and the study protocol for human tissue was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine (IRB#: H18-033-6), University of Yamaguchi Graduate School, and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, as amended in Somerset West in 1996. Written informed consent was obtained from the family of the participant before inclusion in the study (74). Human lymphocytes were obtained from human primary cells and were isolated from the buffy coat of healthy donors obtained from the Etablissement Français du Sang (EFS Pyrénées-Méditerranée, contract #21PLER2019-0106).

Acknowledgements

Special thanks to Jonathan Barthelemy and Aurélie Pedarrieu for their help and support with experimental procedures.

We are grateful to ONARDEP (Dr Bezeid Ould El Mamy) and ISRA-LNERV (Dr Moustapha Modou Lo) for fieldwork and sample collection and isolation. This work was publicly funded by the Montpellier University of Excel- lence (MUSE) through the KIM-RIVE initiative, and the ANR (the French National Research Agency) under the ANR-21-CE15-0041-02.

We are grateful to the staff of UMR PHIM imagery platform and particularly to Marie-Stéphanie Vernerey, for support, training and access to the confocal microscopy platform.

We are grateful to staff of the MRI platform, and particularly Matthieu Dejean, for support, training and access to Imaris platform.

Cell illustrations were made with online Software BioRender.

Competing interests

The authors have no competing interests to declare with respect to in this work

References

(1) Venter M. 2018. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. Curr Opin Virol 28:74–84.

(2) Thomson MC, Muñoz ÁG, Cousin R, Shumake-Guillemot J. 2018. Climate drivers of vector-borne diseases in Africa and their relevance to control programmes. Infect Dis Poverty 7:1–22.

(3) Muñoz LS, Garcia MA, Gordon-Lipkin E, Parra B, Pardo CA. 2018. Emerging Viral Infections and Their Impact on the Global Burden of Neurological Disease. Semin Neurol 38:163–175.

(4) McEntire CRS, Song KW, McInnis RP, Rhee JY, Young M, Williams E, Wibecan LL, Nolan N, Nagy AM, Gluckstein J, Mukerji SS, Mateen FJ. 2021. Neurologic Manifestations of the World Health Organization's List of Pandemic and Epidemic Diseases. Front Neurol 12.

(5) Wiley CA. 2020. Emergent viral infections of the CNS. J Neuropathol Exp Neurol 79:823–842.

(6) Daubney R, Hudson JR. 1931. Enzootic Hepatitis or Rift Valley Fever. An Un-described Virus Disease of Sheep, Cattle and Man from East Africa. J Pathol Bacteriol 34:545–579.

(7) Sasaya T, Palacios G, Briese T, Serio F Di, Groschup MH, Neriya Y, Song JW, Tomitaka Y. 2023. ICTV Virus Taxonomy Profile: Phenuiviridae 2023. J Gen Virol 104:1–2.

(8) Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, Alkhovsky S V., Avšič-Županc T, Ballinger MJ, Bente DA, Beer M, Bergeron É, Blair CD, Briese T, Buchmeier MJ, Burt FJ, Calisher CH, Cháng C, Charrel RN, Choi IR, Clegg JCS, de la Torre JC, de Lamballerie X, Dèng F, Di Serio F, Digiaro M, Drebot MA, Duàn X, Ebihara H, Elbeaino T, Ergünay K, Fulhorst CF, Garrison AR, Gāo GF, Gonzalez JPJ, Groschup MH, Günther S, Haenni AL, Hall RA, Hepojoki J, Hewson R, Hú Z, Hughes HR, Jonson MG, Junglen S, Klempa B, Klingström J, Kòu C, Laenen L, Lambert AJ, Langevin SA, Liu D, Lukashevich IS, Luò T, Lǔ C, Maes P, de Souza WM, Marklewitz M, Martelli GP, Matsuno K, Mielke-Ehret N, Minutolo M, Mirazimi A, Moming A, Mühlbach HP, Naidu R, Navarro B, Nunes MRT, Palacios G, Papa A, Pauvolid-Corrêa A, Pawęska JT, Qiáo J, Radoshitzky SR, Resende RO, Romanowski V, Sall AA, Salvato MS, Sasaya T, Shěn S, Shí X, Shirako Y, Simmonds P, Sironi M, Song JW, Spengler JR, Stenglein MD, Sū Z, Sūn S, Táng S, Turina M, Wáng B, Wáng C, Wáng H, Wáng J, Wèi T, Whitfield AE, Zerbini FM, Zhāng J,

Zhāng L, Zhāng Y, Zhang YZ, Zhāng Y, Zhou X, Zhū L, Kuhn JH. 2019. Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. Arch Virol 164:1949–1965.

(9) Wright D, Kortekaas J, Bowden TA, Warimwe GM. 2019. Rift Valley fever: biology and epidemiology. J Gen Virol 100:1187–1199.

(10) McMillen CM, Hartman AL. 2018. Rift Valley fever in animals and humans: Current perspectives. Antiviral Res 156:29–37.

(11) Bron GM, Strimbu K, Cecilia H, Lerch A, Moore SM, Tran Q, Perkins TA, Ten Bosch QA. 2021. Over 100 years of rift valley fever: A patchSeroprevalence and associated risk factors of selected zoonotic viral hemorrhagic fevers in Tanzaniawork of data on pathogen spread and spillover. Pathogens 10.

(12) Wang Z, Pei S, Ye R, Chen J, Cheng N, Zhao M, Cao W, Jia Z. 2024. Increasing evolution, prevalence, and outbreaks for rift valley fever virus in the process of breaking geographical barriers. Sci Total Environ 917:170302.

(13) Kwaśnik M, Rożek W, Rola J. 2021. Rift Valley fever - A growing threat to humans and animals. J Vet Res. Sciendo https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0009.

(14) Gibson S, Noronha LE, Tubbs H, Cohnstaedt LW, Wilson WC, Mire C, Mitzel D, Anyamba A, Rostal M, Linthicum KJ. 2023. The increasing threat of Rift Valley fever virus globalization: strategic guidance for protection and preparation. J Med Entomol 60:1197–1213.

(15) Métras R, John Edmunds W, Youssouffi C, Dommergues L, Fournié G, Camacho A, Funk S, Cardinale E, Le Godais G, Combo S, Filleul L, Youssouf H, Subiros M. 2020. Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic. PNAS https://doi.org/10.1073/pnas.2004468117/-/DCSupplemental.

(16) McIntosh BM, Russell D, Dos Santos I, Gear JHS. 1980. Rift Valley fever in humans in South Africa. South African Med J 58:803–806.

(17) Javelle E, Lesueur A, Pommier de Santi V, de Laval F, Lefebvre T, Holweck G, Durand GA, Leparc-Goffart I, Texier G, Simon F. 2020. The challenging management of Rift Valley Fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. Ann Clin Microbiol Antimicrob 19:4.

(18) Ikegami T, Makino S. 2011. The pathogenesis of Rift Valley fever. Viruses 3:493–519.

(19) Anywaine Z, Lule SA, Hansen C, Warimwe G, Elliott A. 2022. Clinical manifestations of Rift Valley fever in humans: Systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis 16:e0010233.

(20) D. J. van Velden, J. Meyer, J. Olivier, J. Gear, B. Mcintosh. 1977. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. undefined.

(21) Alrajhi AA, Al-Semari A, Al-Watban J. 2004. Rift Valley Fever Encephalitis. Emerg Infect Dis 10:554–555.

(22) Laughlin LW, Meegan JM, Strausbaugh LJ, Moren DM, Watten RH. 1979. Epidemic rift valley fever in Egypt: Observations of the spectrum of human illness, p. 630–633. In Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Trans R Soc Trop Med Hyg.

(23) Hartman AL, Powell DS, Bethel LM, Caroline AL, Schmid RJ, Oury T, Reed DS. 2014. Aerosolized Rift Valley Fever Virus Causes Fatal Encephalitis in African Green Monkeys and Common Marmosets. J Virol 88:2235–2245.

(24) Smith DR, Steele KE, Shamblin J, Honko A, Johnson J, Reed C, Kennedy M, Chapman JL, Hensley LE. 2010. The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. Virology 407:256–267.

(25) Odendaal L, Davis AS, Venter EH. 2021. Insights into the Pathogenesis of Viral Haemorrhagic Fever Based on Virus Tropism and Tissue Lesions of Natural Rift Valley Fever. Viruses 13.

(26) Connors KA, Hartman AL. 2022. Advances in Understanding Neuropathogenesis of Rift Valley Fever Virus. Annu Rev Virol 9:437–450.

(27) Boyles DA, Schwarz MM, Albe JR, McMillen CM, O'Malley KJ, Reed DS, Hartman AL. 2021. Development of Rift valley fever encephalitis in rats is mediated by early infection of olfactory epithelium and neuroinvasion across the cribriform plate. J Gen Virol 102.

(28) Gray KK, Worthy MN, Juelich TL, Agar SL, Poussard A, Ragland D, Freiberg AN, Holbrook MR. 2012. Chemotactic and inflammatory responses in the liver and brain are associated with pathogenesis of rift valley fever virus infection in the mouse. PLoS Negl Trop Dis 6.

(29) Dodd KA, McElroy AK, Jones TL, Zaki SR, Nichol ST, Spiropoulou CF. 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 Negl Trop Dis 8.

(30) Albe JR, Boyles DA, Walters AW, Kujawa MR, McMillen CM, Reed DS, Hartman AL. 2019. Neutrophil and macrophage influx into the central nervous system are inflammatory components of lethal Rift Valley fever encephalitis in rats. PLoS Pathog 15:e1007833.

(31) Walters AW, Kujawa MR, Albe JR, Reed DS, Klimstra WB, Hartman AL. 2019. Vascular permeability in the brain is a late pathogenic event during Rift Valley fever virus encephalitis in rats. Virology 526:173–179.

(32) Dodd KA, McElroy AK, Jones MEB, Nichol ST, Spiropoulou CF. 2013. Rift Valley Fever Virus Clearance and Protection from Neurologic Disease Are Dependent on CD4 + T Cell and Virus-Specific Antibody Responses . J Virol 87:6161–6171.

(33) Connors KA, Frey ZD, Demers MJ, Wills ZP, Hartman AL. 2024. Acute Rift Valley fever virus infection induces inflammatory cytokines and cell death in ex vivo rat brain slice culture. J Gen Virol 105:1–13.

(34) Bird BH, McElroy AK. 2016. Rift Valley fever virus: Unanswered questions. Antiviral Res 132:274–280.

(35) Reinhold AK, Rittner HL. 2017. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. Pflugers Arch 469:123–134.

(36) Kadry H, Noorani B, Cucullo L. 2020. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. Fluids Barriers CNS 17:1–24.

(37) McConnell HL, Mishra A. 2022. Cells of the Blood–Brain Barrier: An Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. Methods Mol Biol 2492:3–24.

(38) Worzfeld T, Schwaninger M. 2016. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 36:340–362.

(39) Constant O, Maarifi G, Blanchet FP, Van de Perre P, Simonin Y, Salinas S. 2022. Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections. Front Immunol 13:1–15.

(40) Cain MD, Salimi H, Diamond MS, Klein RS. 2019. Mechanisms of Pathogen Invasion into the Central Nervous System. Neuron 103:771–783.

(41) Deligne C, Hachani J, Duban-Deweer S, Meignan S, Meignan S, Meignan S, Leblond P, Carcaboso AM, Sano Y, Shimizu F, Kanda T, Gosselet F, Dehouck MP, Mysiorek C. 2020. Development of a human in vitro blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. Fluids Barriers CNS 17:1–15.

(42) Dehouck M -P, Méresse S, Delorme P, Fruchart J -C, Cecchelli R. 1990. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood–Brain Barrier In Vitro. J Neurochem 54:1798–1801.

(43) Dehouck M -P, Jolliet-Riant P, Brée F, Fruchart J -C, Cecchelli R, Tillement J -P. 1992. Drug Transfer Across the Blood-Brain Barrier: Correlation Between In Vitro and In Vivo Models. J Neurochem 58:1790–1797.

(44) Dehouck M-P, Tachikawa M, Hoshi Y, Omori K, Maurage C-A, Strecker G, Dehouck L, Boucau M-C, Uchida Y, Gosselet F, Terasaki T, Karamanos Y. 2022. Quantitative Targeted Absolute Proteomics for Better Characterization of an In Vitro Human Blood–Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells. Cells 11:3963.

(45) Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. 2014. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. PLoS One 9.

(46) Ly HJ, Ikegami T. 2016. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins. Virol J 13:118.

(47) Quellec J, Pédarrieu A, Piro-Mégy C, Barthelemy J, Simonin Y, Salinas S, Cêtre-Sossah C. 2023. Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes. Emerg Microbes Infect 12.

(48) Gaume L, Chabrolles H, Bisseux M, Lopez-coqueiro I, Dehouck L, Mirand A, Henquell C, Gosselet F, Archimbaud C, Bailly J. 2024. Enterovirus A71 crosses a human blood–brain barrier model through infected immune cells 12.

(49) Constant O, Barthelemy J, Bolloré K, Tuaillon E, Gosselet F, Chable-Bessia C, Merida P, Muriaux D, Van de Perre P, Salinas S, Simonin Y. 2021. SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects. Front Immunol 12:1–13.

(50) Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, Cadar D, Savini G, Teodori L, Monaco F, Schmidt-Chanasit J, Saiz J-C, Gonzales G, Lecollinet S, Beck C, Gosselet F, van de Perre P, Foulongne V, Salinas S, Simonin Y. 2021. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. J Neuroinflammation 18:11.

(51) Constant O, Maarifi G, Barthelemy J, Martin MF, Tinto B, Savini G, Van de Perre P, Nisole S, Simonin Y, Salinas S. 2023. Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood–brain barrier integrity. Emerg Microbes Infect 12.

(52) Clé M, Desmetz C, Barthelemy J, Martin M-F, Constant O, Maarifi G, Foulongne V, Bolloré K, Glasson Y, De Bock F, Blaquiere M, Dehouck L, Pirot N, Tuaillon E, Nisole S, Najioullah F, Van de Perre P, Cabié A, Marchi N, Gosselet F, Simonin Y, Salinas S. 2020. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. MBio 11.

(53) Terasaki K, Kalveram B, Johnson KN, Juelich T, Smith JK, Zhang L, Freiberg AN, Makino S. 2021. Rift valley fever virus 78kda envelope protein attenuates virus replication in macrophage-derived cell lines and viral virulence in mice. PLoS Negl Trop Dis 15.

(54) Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L. 2015. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. Brain Res 1594:15–26.

(55) Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS. 2015. Interferon-λ: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. Immunity 43:15–28.

(56) Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, Bouloy M. 1995. Characterization of Clone 13, a Naturally Attenuated Avirulent Isolate of Rift Valley Fever Virus, which is Altered in the Small Segment. Am J Trop Med Hyg 53:405–411.

(57) Rizzi E, Deligne C, Dehouck L, Bilardo R, Sano Y, Shimizu F, Kanda T, Resmini M, Gosselet F, Dehouck MP, Mysiorek C. 2021. A Triple Culture Cell System Modeling the Human Blood-Brain Barrier. J Vis Exp 2021.

(58) Rustenhoven J, Jansson D, Smyth LC, Dragunow M. 2017. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. Trends Pharmacol Sci 38:291–304.

(59) Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. Virology 397:130–138.

(60) Lee H-S, Namkoong K, Kim D-H, Kim K-J, Cheong Y-H, Kim S-S, Lee W-B, Kim K-Y. 2004. Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. Microvasc Res 68:231–238.

(61) Higashi T, Saito AC, Chiba H. 2024. Damage control of epithelial barrier function in dynamic environments. Eur J Cell Biol 103:151410.

(62) Jensen CJ, Massie A, De Keyser J. 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. J Neuroimmune Pharmacol 8:824–839.

(63) Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR. 2023. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. Acta Neuropathol Commun 11:1–28.

(64) Hosking MP, Lane TE. 2010. The Role of Chemokines during Viral Infection of the CNS. PLoS Pathog 6:e1000937.

(65) van Jansen Vuren P, Shalekoff S, Grobbelaar AA, Archer BN, Thomas J, Tiemessen CT, Paweska JT, Jansen Van Vuren P, Shalekoff S, Grobbelaar AA, Archer BN, Thomas J, Tiemessen CT, Paweska JT. 2015. Serum levels of inflammatory cytokines in Rift Valley fever patients are indicative of severe disease. Virol J 12:159.

(66) Velandia ML, Castellanos JE. 2012. Flavivirus Neurotropism, Neuroinvasion, Neurovirulence and Neurosusceptibility: Clues to Understanding Flavivirus- and Dengue-Induced EncephalitisViral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions. InTech.

(67) Sissoko D, Giry C, Gabrie P, Tarantola A, Pettinelli F, Collet L, D'Ortenzio E, Renault P, Pierre V. 2009. Rift valley fever, mayotte, 2007-2008. Emerg Infect Dis 15:568–570.

(68) El Mamy ABO, Baba MO, Barry Y, Isselmou K, Dia ML, El Kory MOB, Diop M, Lo MM, Thiongane Y, Bengoumi M, Puech L, Plee L, Claes F, de la Rocque S, Doumbia B, Ould El Mamy AB, Baba MO, Barry Y, Isselmou K, Dia ML, Hampate B, Diallo MY, El Kory MOB, Diop M, Lo MM, Thiongane Y, Bengoumi M, Puech L, Plee L, Claes F, de la Rocque S, Doumbia B. 2011. Unexpected rift valley fever outbreak, Northern Mauritania. Emerg Infect Dis 17:1894–1896.

(69) Marton RM, Pașca SP. 2020. Organoid and Assembloid Technologies for Investigating Cellular Crosstalk in Human Brain Development and Disease. Trends Cell Biol 30:133–143.

(70) Lozach P-Y, Kühbacher A, Meier R, Mancini R, Bitto D, Bouloy M, Helenius A. 2011. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. Cell host {\&} microbe 10:75–88.

(71) El Mamy AB, Lo MM, Thiongane Y, Diop M, Isselmou K, Doumbia B, Baba MO, El Arbi AS, Lancelot R, Kane Y, Albina E, Ce'tre-Sossah C, Cêtre-Sossah C, Ce'tre-Sossah C, Cêtre-Sossah C. 2014. Comprehensive phylogenetic reconstructions of Rift Valley fever virus: the

907 2010 northern Mauritania outbreak in the Camelus dromedarius species. Vector Borne Zoonotic
908 Dis 14:856–861.

909 (72) Cêtre-Sossah C, Zeller H, Grandadam M, Caro V, Pettinelli F, Bouloy M, Cardinale E,
910 Albina E. 2012. Genome analysis of Rift Valley fever virus, Mayotte. Emerg Infect Dis 18:969–
911 971.

912 (73) Kärber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
913 Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 162:480–483.

914 (74) Shimizu F, Sano Y, Abe M aki, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, Kanda T. 2011. Peripheral
915 nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through
916 the secretion of various soluble factors. J Cell Physiol 226:255–266.

917 (75) Pedroso DCS, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E, Ferreira
918 L. 2011. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells
919 co-cultured with endothelial cells. PLoS One 6.

920 (76) Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time
921 quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402–408.

Figures

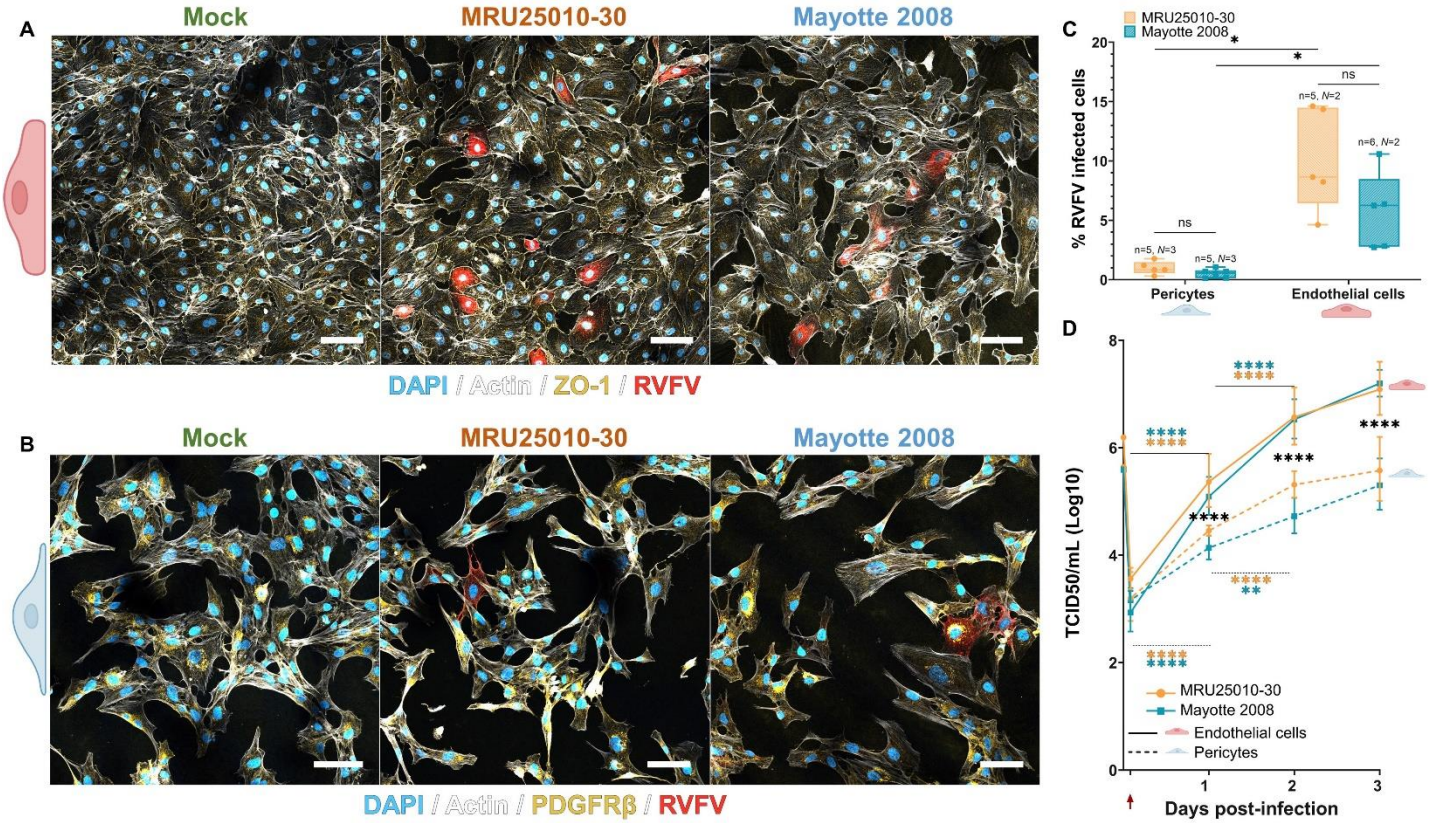


Figure 1: RVFV infects and replicates the endothelial cells and pericytes that make up the human blood brain barrier (BBB) differently. Human primary endothelial cells (hEC) and human primary pericytes were infected by two distinct RVFV strains (MRU25010-30 and Mayotte 2008) or cell medium only (Mock) at a multiplicity of infection (MOI) of 1. After 24h of infection, cells were fixed and stained with DAPI (blue, nucleus), an actin probe (white, cytoskeleton), RVFV specific anti-N antibody (red, RVFV) and cell specific markers (yellow) depending on the type of cell: **A/** hEC (ZO-1) and **B/** pericytes (PDGFRβ). Images were analyzed using confocal microscopy and are representative of each merged staining per condition. Scale Bar, 20µm. **C/** Confocal microscopy images representative of a minimum of two independent experiments, the percentage of RVFV-infected cells for each cell type was analyzed by counting labeled infected cells compared with the total number of cells at 48hpi (counting ≥ 500 cells per replicate, Generalized Linear Model, *p*-value: * <0.05). **D/** Supernatants of Mock- and RVFV-infected cells (solid line for hEC, dashed line for pericytes) were harvested at different time points post-infection and titrated using the TCDI50 method (red arrow: removal of inoculum and washing). Results are representative of a minimum of two independent experiments (n = 6/*N*=2 for endothelial cells and n = 7,12,12,6/*N*=3,4,4,2 for pericytes) and are expressed as geometric mean +/- 95% confidence interval (CI). Linear model showed significance between titers of each cell type at the different time points (black, strain-independent) or between titers of two different time points for each strain and each cell type (blue for Mayotte 2008, orange for MRU25010-30)(*p*-value: *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001).

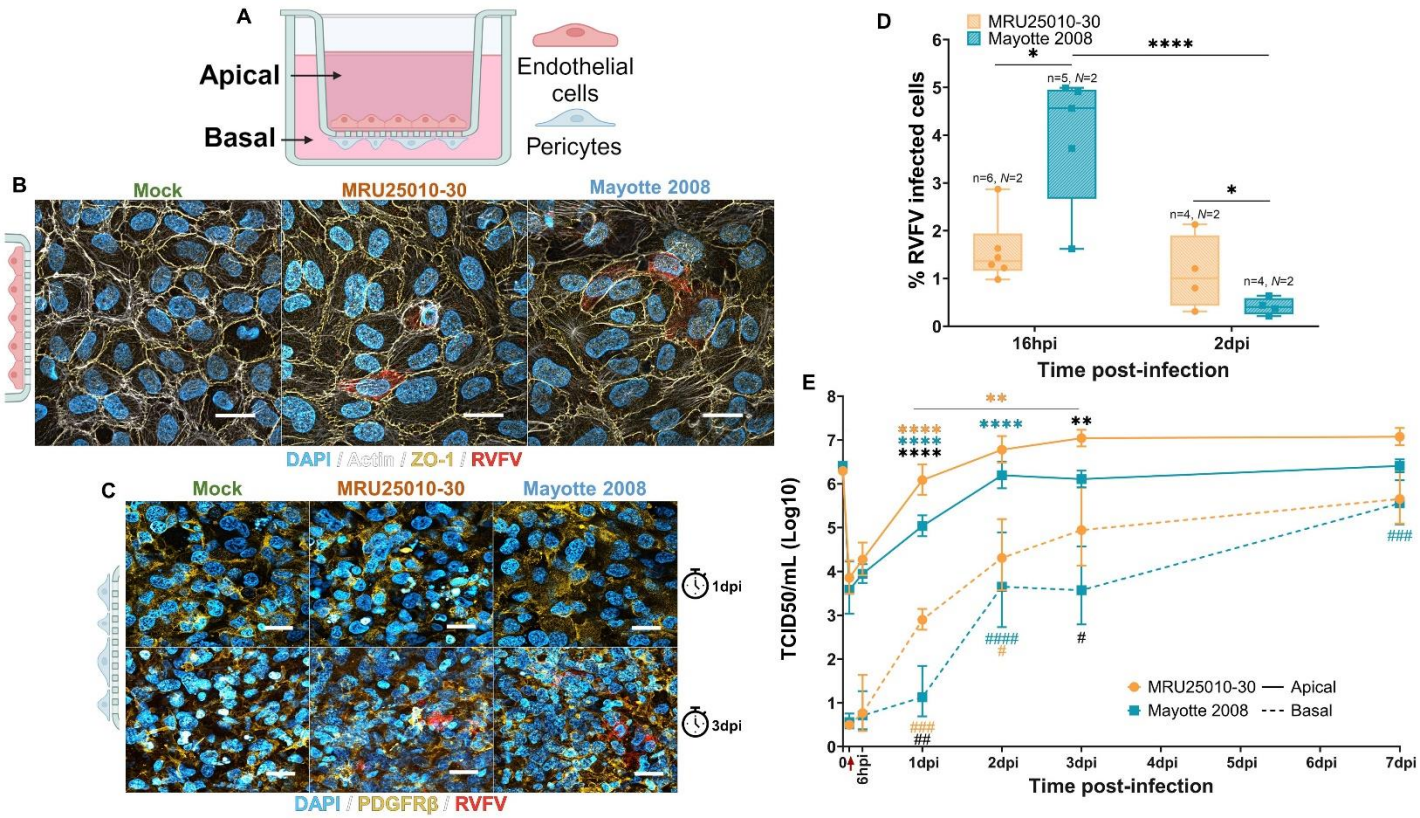


Figure 2: RVFV can cross the human BBB by direct infection of human brain-like endothelial cells (hBLECs). A/ *In vitro* model of human BBB consisting of human endothelial cells plated on the apical side of transwells and differentiated in hBLEC by co-incubation with human brain pericytes plated on the basal side of the transwell. BBB was infected on the apical side with two RVFV strains (MRU25010-30 and Mayotte 2008) or medium only (Mock) at a MOI of 1. After infection, cells were fixed and stained with DAPI (blue, nucleus), actin probe (white, cytoskeleton), RVFV specific anti-N antibody (red, RVFV) and cell markers (yellow) depending on the cell type: **B/** hBLEC (ZO-1) at 1dpi (day post infection) and **C/** pericytes (PDGFRβ) at 1dpi (top panels) and 3dpi (bottom panels). Transwells were analyzed by confocal microscopy and are representative of each merged labeling for each condition. Scale Bar, 10µm. **D/** Percentage of RVFV-infected hBLECs were analyzed by counting labeled infected cells compared with the total number of cells at 16hpi (hours post infection) and 2dpi (counting ≥ 1000 cells, Generalized linear model (GLM): *p*-value: *p<0.05, ****p<0.0001). **E/** Supernatants of RVFV- and mock- infected BBB (solid line: apical supernatants, dashed line: basal supernatants) were harvested at different time points post-infection and titrated using the TCDI50 method (red arrow: removal of inoculum and washing). Results are representative of at least 2 independent experiments (n=6,6,9,6,9,9/*N*=2,2,3,2,3,3) and are expressed as geometric mean +/- 95% confidence interval (CI). GLM for each compartment independently shows significant difference in the apical compartment (*) or in the basal compartment (#) between titers of each strain at the different time points (black) or between titers of a time point with the previous time points for each strain (blue for Mayotte 2008, orange for MRU25010-30, p-value: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

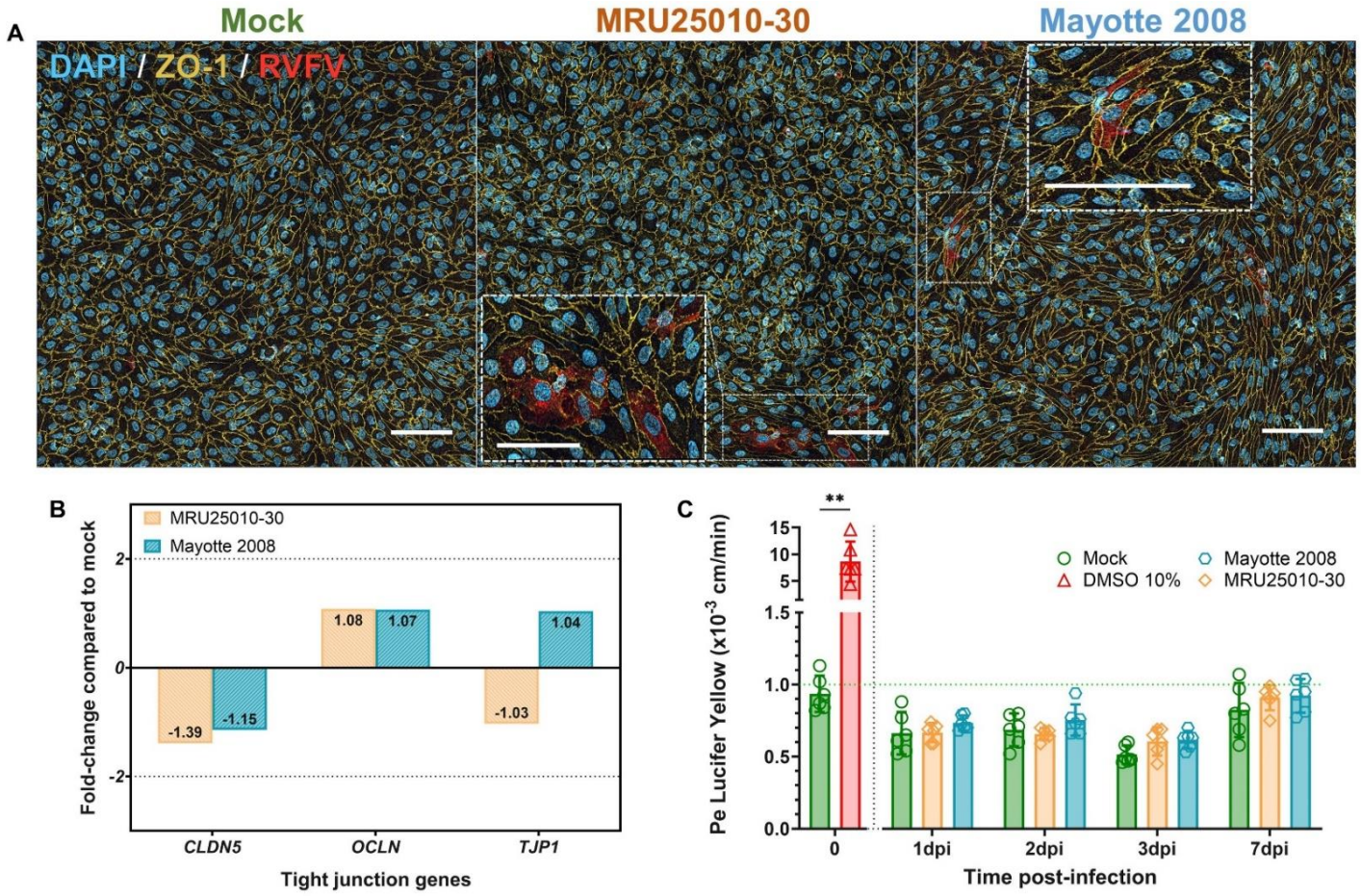


Figure 3: RVFV infection of human BBB did not impair tight junction protein scaffolds and barrier integrity. Human BLECs were infected on the apical side of the transwell with two distinct strains of RVFV (MRU25010-30 and Mayotte 2008) or medium only (Mock), MOI 1. **A/** At 2 days post infection, cells were fixed and stained with DAPI (blue, nucleus), RVFV specific anti-N antibody (red, RVFV) and anti-tight junction (TJ) protein ZO-1 (yellow). Transwells were analysed by confocal microscopy and images are representative of each labeling merged for each condition. Dashed squares correspond to a zoom on the region of interest. Scale Bar, 100µm. **B/** Expression of TJ proteins in RVFV-infected hBLEC (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 1) at 48hpi was assayed by measuring gene mRNA expression with RT-qPCR using the fold-change method standardized with the housekeeping gene *HPRT1*. Genes were considered as upregulated with a fold-change > 2 or downregulated with a fold-change <-2 (one-way ANOVA on Delta Ct values with Tukey correction, n= 6/*N*=2). **C/** The permeability coefficient (Pe) was measured using the Lucifer Yellow transport assay for Mock and RVFV-infected BBB at different time points during infection. Treatment with 10% DMSO for 30min corresponds to the positive control of this assay (impaired integrity) and Pe < 1×10^{-3} cm/min (green dashed line) corresponds to an impermeable/tight BBB. Results are expressed as mean +/- 95% confidence interval (CI) and a Mann-Whitney test between DMSO control and Mock at T0 validated the assay (n=6/*N*=2, *p*-value: **p<0.01). Generalized linear model (GLM) was used to test significance between Pe of BBB infected by each strain and compared to Mock controls at the different time points (n=6/*N*=2).

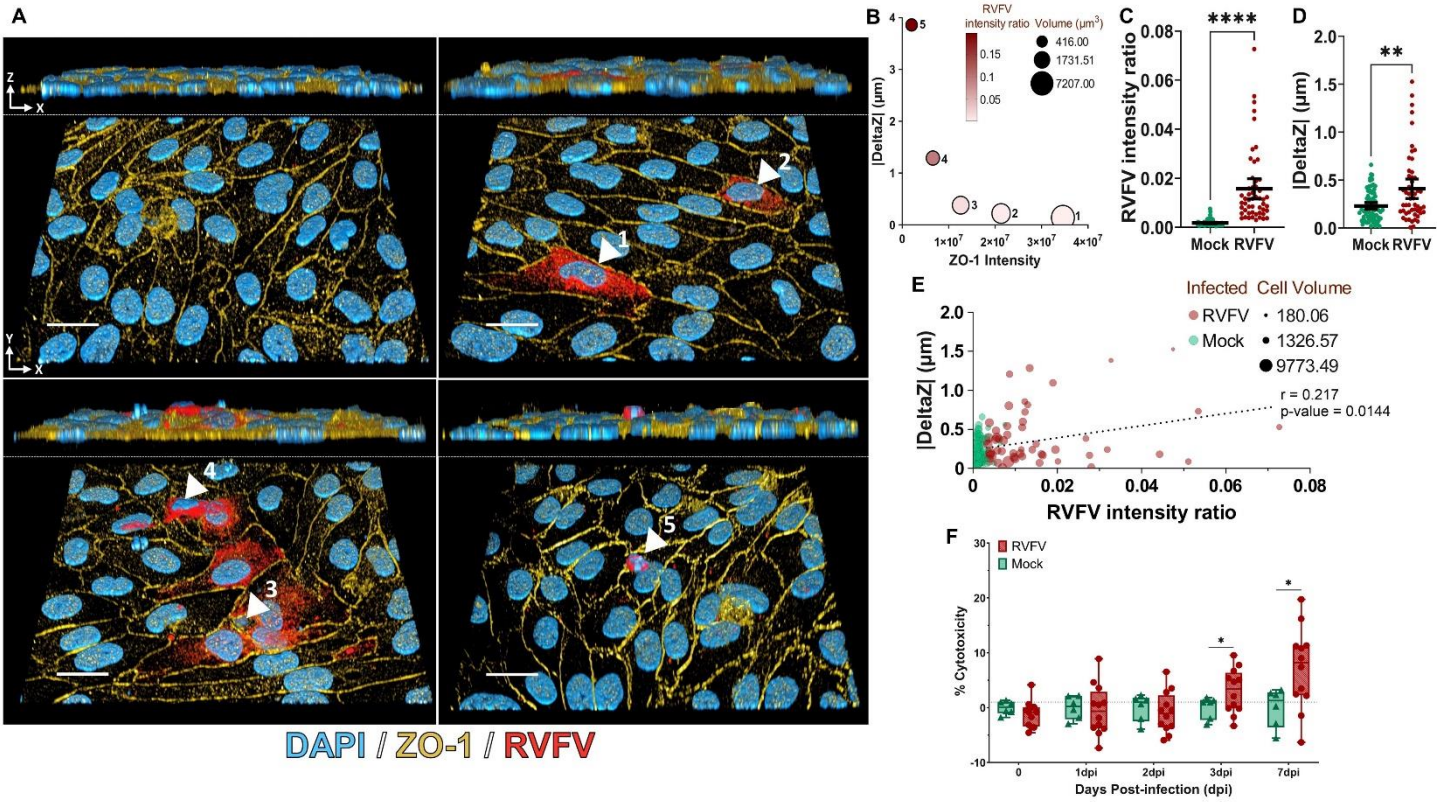


Figure 4: RVFV-infected hBLEC were gradually eliminated from the endothelial monolayer. In order to explore impact of RVFV on hBLEC viability and elimination, the BBB model was infected on the apical side with RVFV or medium only (Mock), MOI 1. **A/** At 16hpi and 1dpi, cells were fixed and stained with DAPI (blue, nucleus), RVFV specific anti-N antibody (red, RVFV), anti-GAPDH (not represented) and anti-tight junction (TJ) protein antibody (yellow, ZO-1). Images were acquired using confocal microscopy and are representative of each staining merged for each condition (3D Viewer, ImageJ software). For each image, the top panel corresponds to the view on the Z-axis, the associated bottom panel to the view on the Y-axis. White arrows indicate different states of infected-cells numbered by their infectious state according to the RVFV intensity ratio (mean of RVFV labelling fluorescence/volume): early (1) to late infected-cells (5). Scale Bar, 20µm. **B/** For the cells numbered 1 to 5, RVFV intensity ratio, cell volume (µm^3), absolute values of cell height compared to the mean of uninfected-cell height of the layer (|DeltaZ|) and fluorescence intensity corresponding to ZO-1 labelling were obtained using Imaris software. For each condition, RVFV- and mock-infected cells analyzed by confocal microscopy and Imaris software (n=52/*N*=4 and n=74/*N*=2, respectively), **C/** RVFV intensity ratios were determined for each cell. Ratios are represented as mean +/- 95% confidence interval (CI) (Mann-Whitney, *p*-value: ****p<0.0001). **D/** |DeltaZ| were determined for each cell and are represented as mean +/- 95% confidence interval (CI) (Mann-Whitney, p-value: **p<0.01). **E/** For each cell, |DeltaZ|, cell volume (µm) and RVFV intensity ratio were represented and correlation between |DeltaZ| and RVFV intensity ratio values were confirmed by Spearman Test (r=0.217, n=126/*N*=4, p-value<0.05). **F/** To explore cytotoxicity of hBLEC during RVFV infection, LDH activity was measured in the apical supernatant after several days post-infection (dpi) and is expressed as percentage of cytotoxicity. Significance between RVFV and mock control were analyzed by two-way ANOVA model (n=6/*N*=2 for mock-infected cells and n=12/*N*=2 for RVFV-infected cells, *p*-value: *<0.05)

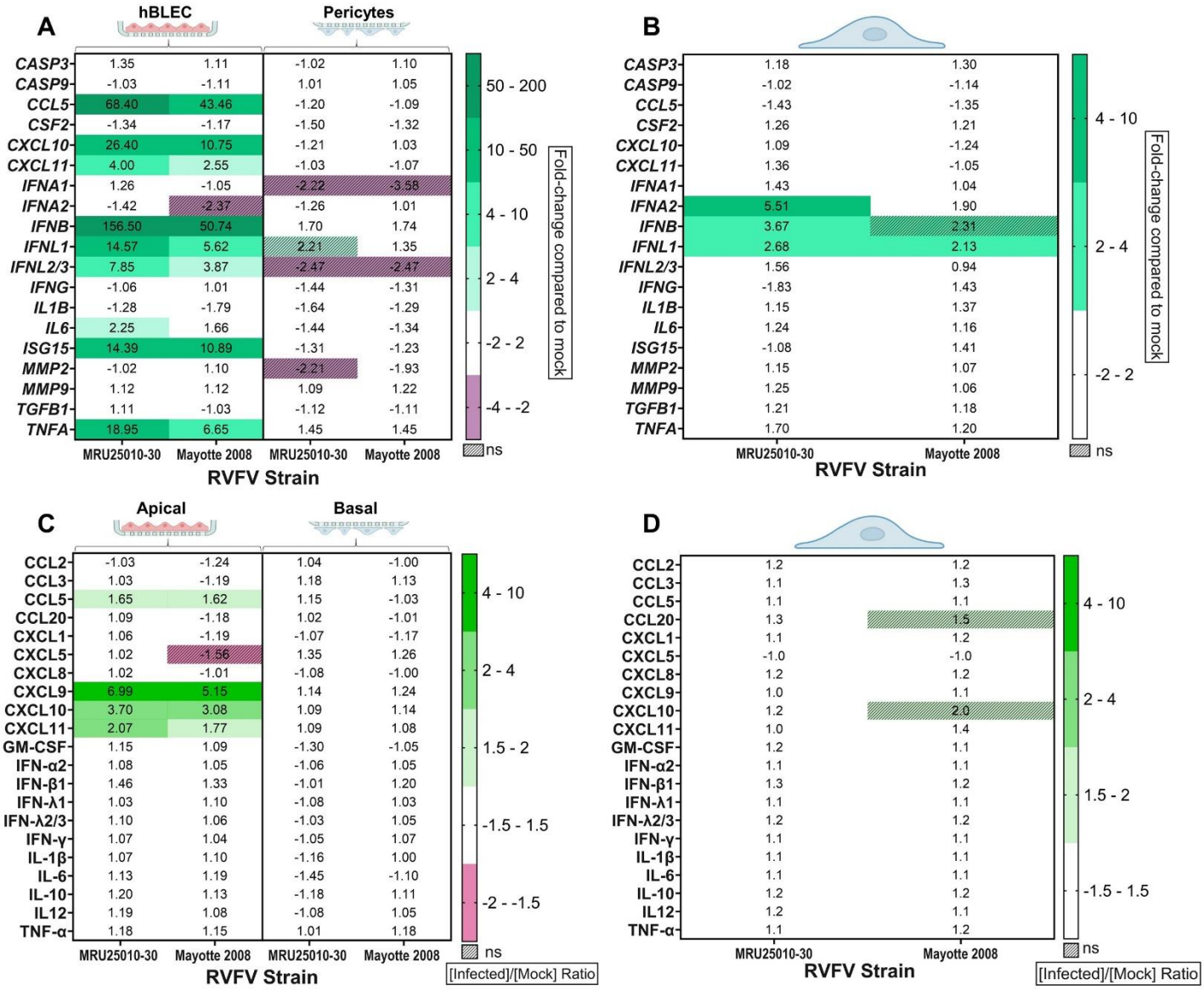


Figure 5: hBLEC but not pericytes induced a moderate type I interferon response after RVFV infection. Immune response induced by RVFV-infected human BBB (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 1, hBLEC and pericytes on transwells) at 48 hours post-infection (hpi) (**A**/) or immune response induced by RVFV-infected pericytes in monoculture (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 1) after 24 hpi (**B**/), was assayed by measuring gene mRNA expression with RT-qPCR using the fold-change method standardized on the housekeeping gene *HPRT1* (upregulated in green; downregulated in purple). All upregulated or downregulated genes compared to mock expression have a *p*-value<0.05 (For each gene, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis on Delta Ct values for each compartment independently, n=6/*N*=2) or are hatched when not-significant). Cytokines secreted in RVFV-infected BBB supernatants (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 1, apical and basal) (**C**/) or in RVFV-infected pericyte supernatants in monoculture (MRU25010-30 and Mayotte 2008, MOI 1) (**D**/) at 48hpi were measured using FACS multiplex assays and compared to mock concentrations. Results are expressed as protein levels with the ratio of mean protein concentration in infected conditions to that in mock conditions (upregulated in green; downregulated in red). Modifications of protein expression represented on the heatmap have a *p*-value<0.05 or are hatched when not-significant (for each protein, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis on protein concentration values for each compartment independently, n=6/*N*=2).

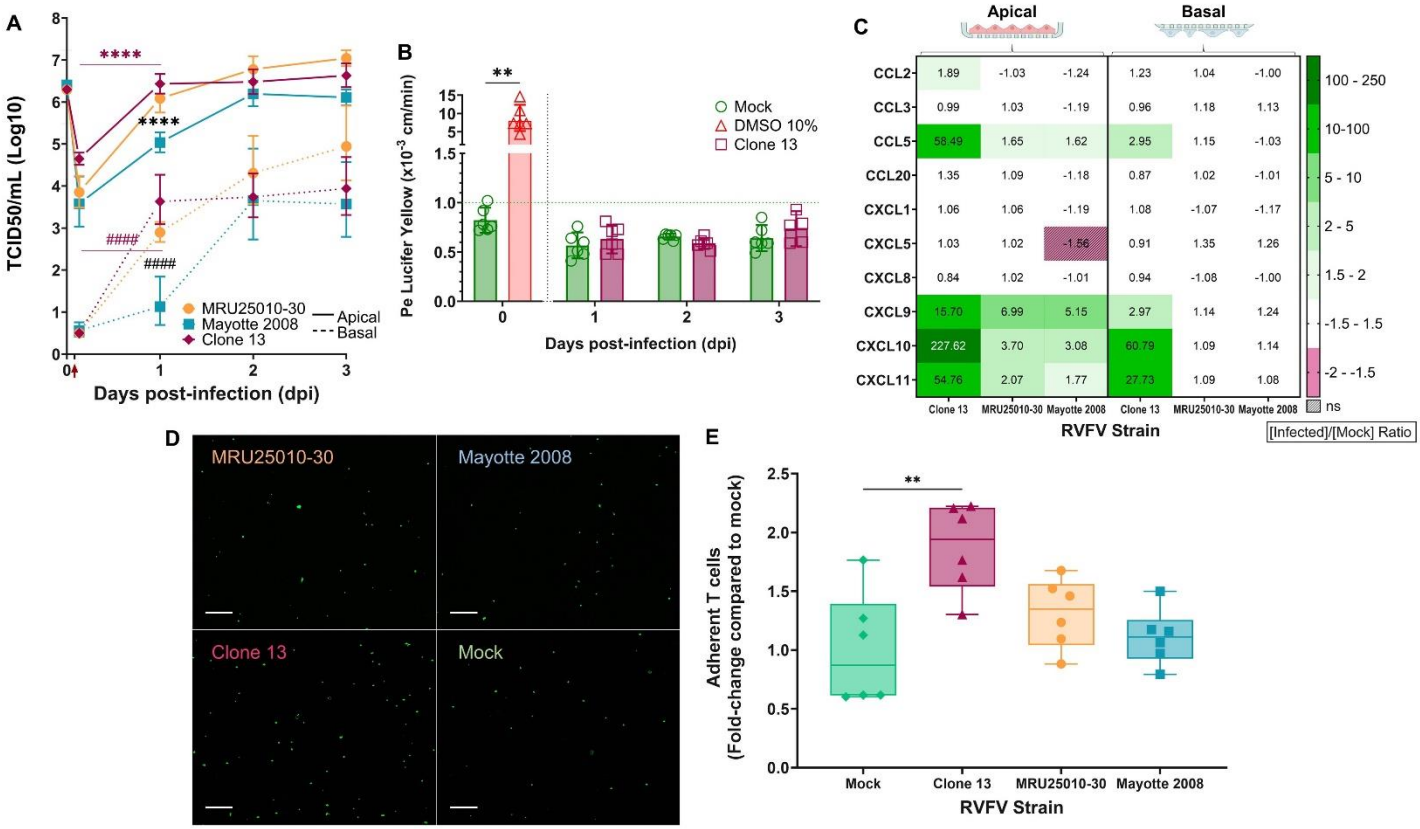


Figure 6: The lack of virulence factor NSs did not impair RVFV neuroinvasion but induced a strong immune response by blood brain barrier (BBB). In order to explore the ability of Clone 13, a naturally NSs-deleted RVFV strain, to reach the brain (basal) from the blood (apical) compartment by crossing BBB, we infected the BBB model on the apical side with three RVFV strains (MRU25010-30, Mayotte 2008 and Clone 13) or medium only (Mock), MOI 1. **A/** Supernatants of Mock- and RVFV-infected BBB (solid line: apical supernatants, dashed line: basal supernatants) were harvested at different time points post-infection and titrated using the TCDI50 method (red arrow: removal of inoculum and washing). Results are expressed as geometric mean +/- 95% confidence interval (CI) (n=6,9,6,9/*N*=2,3,2,3 for MRU25010-30 and Mayotte 2008, also presented in Figure 2E, and n=6/*N*=2 for Clone 13). Generalized linear model (GLM) for each compartment independently showed the significance of Clone 13 in the apical (*) or basal compartment (#) compared to titers of others strains at different time points (black) or between titers of the same time point with the previous time points (colored: magenta for Clone 13, p-value: ****p<0.0001). **B/** The permeability coefficient (Pe) was measured using the Lucifer Yellow transport assay for Mock and Clone 13-infected BBB at different time points post-infection. Results are expressed as mean +/- 95% confidence interval (CI). Pe < 1×10^{-3} cm/min (green dashed line) corresponds to an impermeable/tight BBB. Treatment with 10% DMSO for 30min corresponds to the positive control of this assay (impaired integrity, Mann-Whitney test, n=6/*N*=2, p-value: **p<0.01). GLM test significance between Pe of BBB infected by each strain compared to the Mock control at the different time points (n=6/*N*=2, with the exception of Clone 13 at 3dpi n=5/*N*=2). **C/** Cytokines secreted in RVFV-infected BBB supernatant (apical and basal) at 48 hours post-infection (hpi) were measured using FACS multiplex assays and compared to mock. Results are expressed as protein levels by a ratio of mean protein concentration in infected conditions to that in mock condition (upregulation in green, downregulation in red). Modifications of protein expression represented on the heatmap have a p-value<0.05 or are hatched when non-significant (for each protein, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis on protein concentration values for each compartment independently, n=6/*N*=2 for infected conditions and n=12/*N*=4 for Mock). Data presented for MRU25010-30 and Mayotte 2008 are also presented in Figure 5C. **D/** At 48hpi, apical supernatants of RVFV-infected BBB were harvested and co-incubated overnight with human primary T cells. T cells were then CFSE-labelled (green), incubated in the same infected BBB at the apical side and analyzed by acquisition of panoramas of 20 fields with tiles modules. Scale Bar, 100µm. **E/** Adherent CFSE-labelled cells were counted for each condition and fold-change of adherent T cell compared to mock was

determined for each condition by dividing the number of cells by the mean of number of cells in the mock condition (one-way ANOVA, n=6/*N*=2, p-value: **p<0.01)

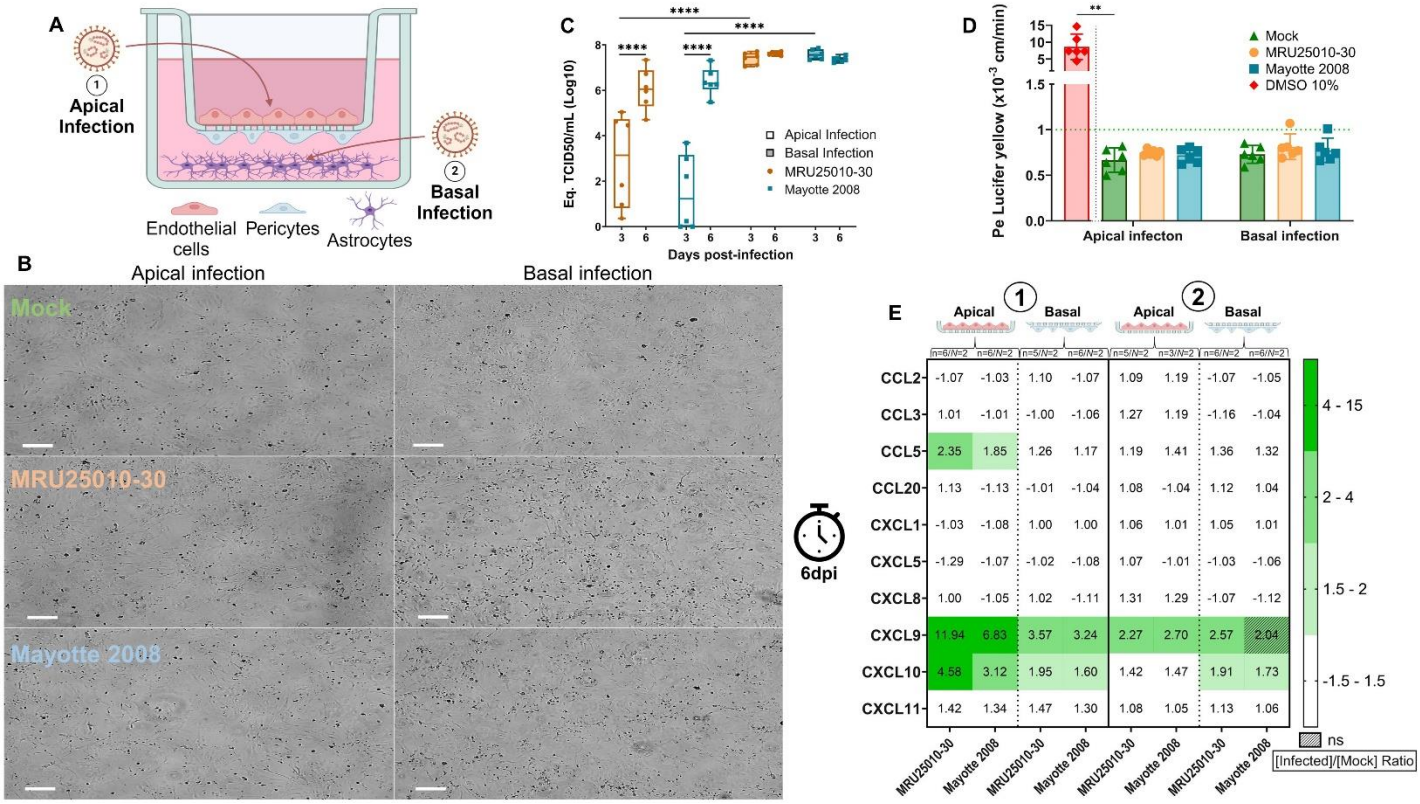


Figure 7: Infection of the blood brain barrier (BBB) by RVFV led to infection of astrocytes but without disruption of BBB integrity. A/ In order to explore the influence of astrocytes on BBB maintenance during RVFV infection, we used a triculture model: hBBB model (i.*e.* hBLEC and pericytes) and human astrocytes on the bottom of the well. Infection was performed on the apical side, MOI (1) or on the basal side, MOI 0.1 (2). **B/** At 6 days post-infection (dpi) with two different RVFV strains (MRU25010-30 and Mayotte 2008) on the apical side (left) or on the basal side (right), images of astrocytes were acquired by phase-contrast microscopy. Scale Bar, 100µm. **C/** From total extracted RNA of RVFV-infected astrocytes after infection of BBB triculture on the apical side (clear) or on the basal side (dark), viral titers expressed as the geometric mean of equivalent TCID50/mL (Eq. TCID50/mL) were determined by RTqPCR (Generalized linear model, n=6/*N*=2, p-value: ****p<0.0001). **D/** At 6dpi, the permeability coefficient (Pe) was measured using the Lucifer Yellow transport assay for Mock and RVFV-infected BBB triculture. Results are expressed as mean +/- 95% confidence interval (CI) and Pe < 1×10^{-3} cm/min (green dashed line) corresponds to an impermeable/tight BBB. Treatment with 10% DMSO for 30min corresponds to the positive control of this assay (impaired integrity, Mann-Whitney test, n=6/*N*=2, p-value: **p<0.01). Generalized linear model test significance between Pe of BBB infected by each strain compared to the Mock control at different time points (n=6/*N*=2). **E/** Cytokines secreted in RVFV-infected BBB triculture supernatant at 6dpi at apical infection (1, MOI of 1) or basal infection (2, MOI of 0.1) by two distinct RVFV strains (MRU25010-30 and Mayotte 2008) were measured using FACS multiplex assays and compared to the mock concentration. Results are expressed as protein levels with a ratio of mean protein concentration in infected conditions to that in the mock condition (upregulation in green). Modifications of protein expression represented on the heatmap have a p-value<0.05 or are hatched when non-significant (for each protein, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis on protein concentration values for each compartment independently).

1062 **Table 1:** Antibodies and dilution used in immunofluorescence assay

Target	First labelling	Dilution (reference)	Secondary labelling	Dilution (Reference)
RVFV N structural protein	Monoclonal mouse IgG1 anti-N RVFV	1:50 (Cirad, 15G6-4B8)	Polyclonal donkey IgG anti-mouse IgG 555	1:500 (Invitrogen A31570)
Junction protein ZO-1	Polyclonal rabbit IgG anti-ZO-1	1:50 (Invitrogen, 61-7300)	Polyclonal donkey IgG anti-rabbit IgG 647	1:500 (Invitrogen A31573)
PDGFRβ	Monoclonal rabbit IgG anti-human PDGFR	1:100 (Abcam, Ab32570)	Polyclonal donkey IgG anti-rabbit IgG 647	1:500 (Invitrogen A31573)
GAPDH	Polyclonal goat IgG anti-human GAPDH	1:25 (Abcam, AB9483)	Polyclonal donkey IgG anti-goat IgG 488	1:500 (Invitrogen A-11055)
Actin			ActinGreen (Ready Probes, Alexa488)	1:50 (Thermofischer, 37110)
Nucleus			DAPI	1:1000 (Sigma-Aldrich, MBD0015)

1063

III. Travaux préliminaires sur l'interaction entre la BHE et les leucocytes : du mécanisme de cheval de Troie au recrutement immunitaire

Les résultats de ce travail de thèse ont confirmé *in vitro* le mécanisme de neuroinvasion du RVFV par infection directe de la BHE, ainsi que la mise en place d'une réponse immunitaire modérée et polarisée par la BHE infectée. Des travaux préliminaires ont permis d'explorer un autre mécanisme de neuroinvasion par la voie hématogène, le mécanisme de cheval de Troie, ainsi que l'impact de cette réponse immunitaire polarisée induite par la BHE sur le recrutement des lymphocytes. En effet, l'hypothèse que le RVFV puisse utiliser des CPA tels que les macrophages ou les cellules dendritiques comme cheval de Troie pour accéder au SNC est toujours actuelle. Ce sont les premières cellules que le RVFV infectent et celles-ci ont la capacité d'accéder au SNC par transmigration lors de l'immunosurveillance[96,171,295,348]. Afin de tester cette hypothèse, une approche *in vitro* a été mise en place afin de mesurer l'adhésion de cellules dendritiques primaires dérivées de monocytes humains infectés par le RVFV sur la BHE. De même, il a été démontré dans les travaux présentés dans la partie précédente que l'infection de la BHE pouvait conduire à la mise en place d'une réponse inflammatoire majorant le recrutement de lymphocytes T humains primaires sur la BHE. Les mécanismes moléculaires n'ayant pas été abordés précédemment, ils seront traités dans cette partie. Par des approches de biologie moléculaire, la surexpression de différentes protéines d'adhésion a été quantifiée pour les lymphocytes T ainsi que pour la BHE infectée elle-même (Figure 27A).

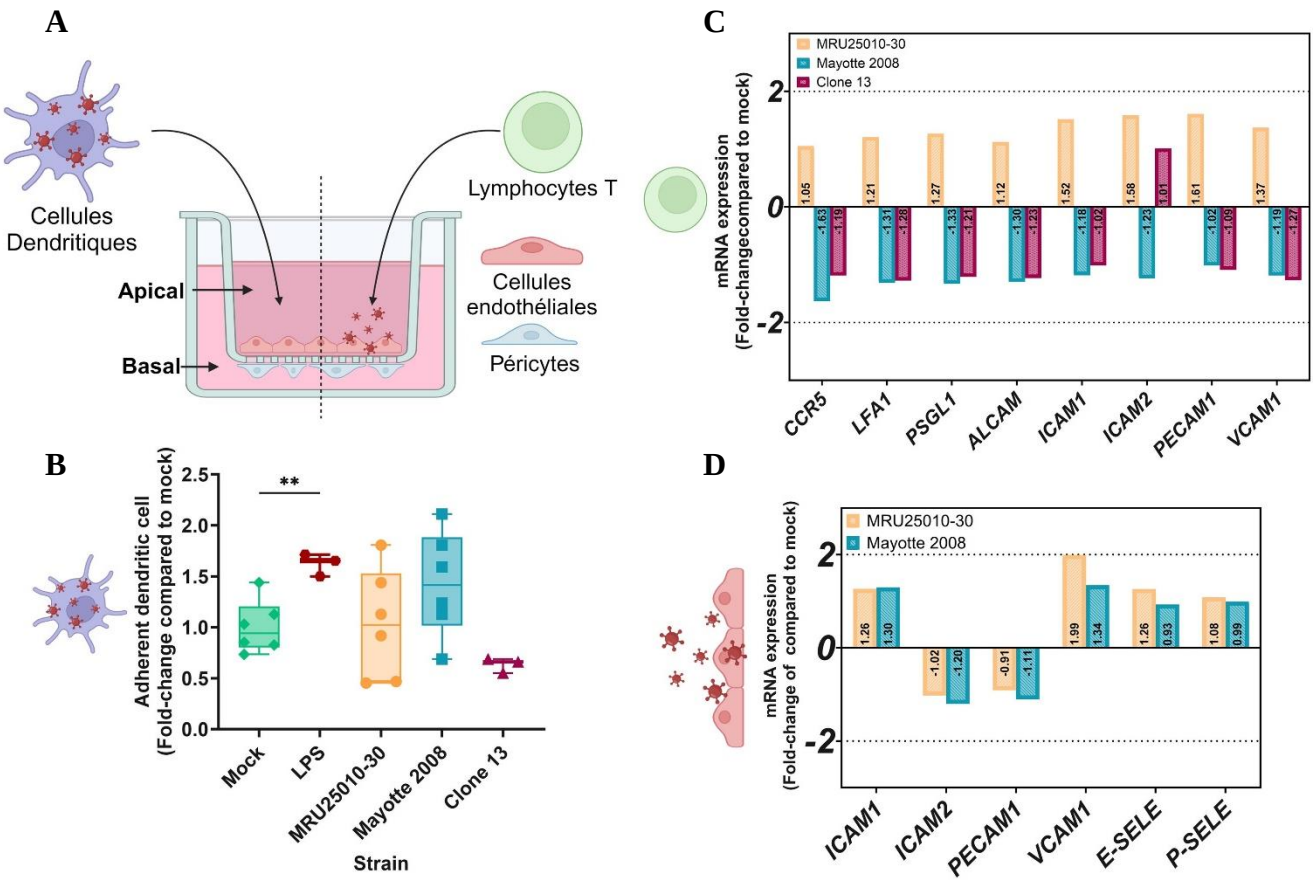


Figure 28 : Exploration de la neuroinvasion du RVFV par le mécanisme de cheval de Troie et le recrutement des lymphocytes à la BHE infectée : A/ Présentation schématique de la méthodologie d'infection utilisée pour étudier le mécanisme de cheval de Troie par les cellules dendritiques infectées par le RVFV (partie gauche) ou le recrutement de lymphocytes T par la BHE infectée par le RVFV (partie droite). **B/** Les cellules dendritiques infectées par le RVFV (souches virales MRU25010-30, Mayotte 2008, Clone 13, MOI 20, 7hpi) ou activées par co-incubation avec du LPS (24hpi, 1µg/mL) ont été marquées par du CFSE puis incubées sur le côté apical de la BHE non-infectée. Les cellules ont ensuite été fixées et plusieurs panoramas ont été acquis par microscopie confocale à fluorescence pour chaque condition. Les cellules dendritiques adhérentes ont ensuite été énumérées puis représentées en fold-change par rapport à la moyenne de cellules énumérées dans la condition non-infectée (ANOVA One-Way, p-value : **p-value<0.01). / Les modèles de BHE ont ensuite été infectés pendant 48hpi du côté apical par les différentes souches de RVFV (MRU25010-30, Mayotte 2008, Clone 13, MOI 1) puis le surnageant a été récolté puis co-incubé sur la nuit avec des lymphocytes T non-infectés. Les ARN des lymphocytes T (**C/**) ou des cellules endothéliales infectées de la BHE (**D/**) ont été extraits et l'expression des ARNm relatifs à plusieurs protéines d'adhésion a été quantifiée par RTqPCR puis exprimée en fold-change comparée à la condition non-infectée (threshold : surexpression (>2), sous-expression (<-2), n=6)

Tout d'abord, les méthodes et paramètres de cultures cellulaires, d'infection, d'analyse de l'adhérence cellulaire et d'analyse de l'expression des ARNm sont identiques à ceux décrits dans l'article 2. Les cellules dendritiques utilisées sont également issues de la convention CNRS/EFS (convention #21PLER2019-0106) et ont, cette fois-ci, été obtenues par différenciation de monocytes primaires après 7 jours de culture en milieu RPMI complémenté avec 500UI/mL de GM-CSF et 500UI/mL d'IL-4. La différenciation des monocytes en cellules dendritiques a été confirmée par l'analyse des marqueurs cellulaires spécifiques par cytométrie en flux (Figure 33, Annexe 7). De plus, il est décrit dans la littérature que l'infection des cellules dendritiques humaines à une MOI de 20 pendant 7h par le RVFV conduit à l'infection de 90% des cellules sans atteinte de leur viabilité cellulaire (communication personnelle, Pr Lozach)[259]. De même, le pré-traitement au LPS pendant 24h est décrit dans la littérature comme majorant l'adhésion des cellules dendritiques à la BHE, et a ainsi servi de contrôle positif[487]. Les réactifs,

les résultats de différenciation des cellules dendritiques ainsi que les amorces de RTqPCR sont détaillés en Annexe 7.

Les résultats préliminaires de ces travaux suggèrent que les cellules dendritiques infectées ne sont pas impliquées dans un mécanisme de cheval de Troie permettant au RVFV d'accéder au SNC humain. En effet, il semble que les cellules dendritiques infectées n'adhérent pas davantage à la BHE, suggérant que leur transmigration n'est pas majorée par l'infection, et cela indépendamment de la souche (Figure 27B). Le facteur de virulence NSs de RVFV déstabilise le squelette d'actine des cellules infectées et perturbe leurs capacités de migration et d'interactions cellule-cellule[275,458]. Ainsi, il semble cohérent que l'infection des cellules dendritiques ne majore pas leurs capacités d'interaction et de transmigration à travers la BHE. Cependant, la souche RVFV délétée en NSs (Clone 13) ne majore pas non plus la transmigration des cellules dendritiques infectées, suggérant alors que l'infection par le RVFV, indépendamment des activités de NSs, ne majore pas la transmigration des cellules dendritiques à travers la BHE. Ces premiers résultats sont donc en faveur d'une neuroinvasion par infection directe des cellules endothéliales qui ne semble pas être majorée par un mécanisme de cheval de Troie. Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent davantage d'exploration pour confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, les paramètres d'infection ont été déterminés en fonction de la littérature, mais l'infection réelle des cellules dendritiques avec ces paramètres et les souches utilisées n'a pas été validée. Il faudrait donc confirmer que ce protocole expérimental permet bien l'infection des cellules dendritiques, par exemple par la quantification des cellules infectées par cytométrie de flux[259]. Il serait intéressant de déterminer l'expression des protéines d'adhésion par les cellules dendritiques infectées, par des approches de biologie moléculaire, comme celles utilisées dans ces travaux préliminaires, ou par quantification des protéines de surface par cytométrie en flux[142]. L'étude plus robuste du mécanisme de cheval de Troie nécessite un modèle *in vitro* de BHE plus complexe permettant de déterminer la transmigration complète des cellules dendritiques du pôle apical vers le pôle basal, et non plus uniquement la première étape d'adhésion (Rolling en anglais). Ce modèle *in vitro* est composé de filtres dont les pores sont plus larges (3µm) et permettent la transmigration complète des cellules sur des temps d'incubation plus longs, comme il a pu être fait sur l'étude de la neuroinvasion de l'entérovirus EV71[129]. Enfin, ce travail ne permet pas de conclure définitivement sur ce mécanisme de neuroinvasion complexe : de nombreux types de leucocytes, tels que les neutrophiles, les macrophages ou encore les lymphocytes T, sont capable de transmigrer à travers la BHE au cours de l'immunosurveillance du SNC et pourrait potentiellement participer au mécanisme de cheval de Troie du RVFV, potentiellement capable de les infecter[134,171]. Il serait donc intéressant de compléter ces travaux en développant la complexité des approches, que ce soit sur les méthodes d'analyses que sur les conditions testées.

Afin d'approfondir les mécanismes d'interaction entre l'environnement inflammatoire de la BHE infectée par le RVFV et le recrutement de leucocytes, l'expression de plusieurs gènes en lien avec la leucopédèse a été explorée pour les lymphocytes et pour les cellules endothéliales. La leucopédèse est médiée par des protéines qualifiées de molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour Cellular Adhesion Molecule en anglais) et qui sont représentées par plusieurs familles de molécules formant des complexes d'interactions : les intégrines (LFA-1, PSGL1), les sélectines (E-Selectin, P-Selectin) et les glycoprotéines dont la superfamille des

immunoglobulines (ICAM, VCAM, PECAM, ALCAM)[488]. Ces protéines CAM ont des interactions différentes et sont exprimées par de nombreuses cellules dont les lymphocytes et les endothéliums. De plus, leur expression est surexprimée en cas d'inflammation afin de majorer le recrutement de cellules immunitaires au site d'infection[154,171,488]. Tout d'abord, la molécule LFA1 est une intégrine présente à la surface des leucocytes et a pour ligands d'autres protéines CAM de la BHE, et notamment ICAM1 et ICAM2[489]. De plus, complétant cette interaction avec les intégrines, les endothéliums activés vont également exprimer d'autres CAM de la famille des sélectines (E-Selectin, P-Selectin) qui vont interagir avec des ligands spécifiques des cellules immunitaires tels que PSGL1. L'ensemble de ces acteurs va participer à cette interaction bilatérale, mais à des niveaux d'affinités différents, ce qui permet le recrutement et la transmigration des cellules immunitaires à travers la BHE, un élément de neuroinflammation[154,171]. En cas d'activation et de mise en place d'un environnement inflammatoire, certains récepteurs à des chimiokines peuvent être surexprimés et participer à la migration des lymphocytes[154]. Il a été démontré que l'infection de la BHE par le RVFV induit une surexpression de CCL5 : l'expression de son récepteur CCR5 présent à la surface des lymphocytes a donc également été évaluée.

Malgré que l'infection de la BHE induise la mise en place d'une réponse inflammatoire, notamment par la surexpression de chimiokine telle que CXLC10 ou CCL5, ces approches préliminaires de biologie moléculaire ont permis de mettre en avant que les lymphocytes mis en contact avec cet environnement inflammatoire n'induisent pas une surexpression des protéines CAM, et cela peu importe la souche de RVFV (Figure 27C). De plus, concernant l'infection de la BHE par les souches de RVFV de terrain, les protéines CAM ne sont également pas surexprimées (Figure 27D), ce qui corrobore avec les résultats présentés précédemment. En effet, l'absence de surexpression des protéines CAM par les lymphocytes ou par la BHE infectée pourrait donc justifier l'absence de majoration du recrutement des lymphocytes, et cela malgré la mise en place d'une inflammation par la BHE infectée par les souches MRU25010-30 et Mayotte 2008. Cependant, ces résultats sont préliminaires et la surexpression des protéines CAM par la BHE infectée par le Clone 13 n'a pas pu être explorée. Afin de conclure, il est important de confirmer que la BHE infectée par le Clone 13 surexprime ces protéines, justifiant alors la majoration du recrutement des lymphocytes observée dans l'article 2. Ainsi, ce recrutement serait potentiellement un mécanisme majoritairement médié par les cellules endothéliales de la BHE de façon NSs-dépendant. Par ailleurs, il est décrit que la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires majore la leucopédèse en induisant la surexpression de protéines CAM par les cellules endothéliales[154]. Or, dans ces travaux, cette inflammation est nettement plus importante dans le cas de l'infection par le Clone 13 comparée aux deux autres souches de terrain qui ne majorent pas ce recrutement. Afin de confirmer l'absence de surexpression des protéines CAM, il serait intéressant de les quantifier à la surface cellulaire par cytométrie en flux, comme ce qui a déjà été fait pour WNV ou USUV[142]. De même, il semble nécessaire d'utiliser une approche plus exhaustive sur l'exploration des CAM en jeu dans cette interaction afin de s'assurer d'une réelle absence de leurs surexpressions en complétant la liste de CAM explorées par d'autres CAM décrites comme essentielles pour les lymphocytes tel que l'intégrine VLA-4[154].

Partie 3 : Discussions, hypothèses et perspectives

Neuroinvasion du RVFV

I. Infection directe de la BHE, atteinte de son intégrité et neuroinflammation

Au cours de ce travail de thèse, il a pu être démontré que le RVFV est capable de franchir *in vitro* la BHE humaine par infection directe et sans induire sa déstabilisation dans les temps précoces d'infection (jusqu'à 7 jours post-infection *a minima*). Le RVFV est un virus qui se dissémine par les vaisseaux sanguins dans l'organisme, notamment après la phase hépatique. Il est donc cohérent qu'il puisse accéder au SNC par un mécanisme de neuroinvasion via la voie hématogène[348,353]. Chez le rongeur, le SNC est un compartiment colonisé tardivement par le RVFV : le rôle de la charge virale et de la virémie dans la cinétique de ce mécanisme de neuroinvasion est une question qui reste encore à explorer. En effet, dans la littérature, il est décrit que la phase hépatique majore la virémie et est nécessaire pour la pathogénèse du RVFV : le déclenchement de la phase neurologique est donc peut-être retardée et corrélée à une virémie suffisante lui permettant de passer à travers la BHE[263,348,361]. Au cours de ces travaux de thèse, une seule MOI a été utilisée et ceci ne permet pas de définir l'existence d'un seuil de concentration potentiel permettant la neuroinvasion par infection directe ni d'établir une cinétique de neuroinvasion reflétant les conditions *in vivo*. Il a été précédemment démontré que le déclenchement de formes neurologiques chez le modèle murin n'est pas dépendant de la phase hépatique : malgré l'absence d'une augmentation de la virémie faisant suite à la phase hépatique, les souris infectées manifestent toujours des encéphalites, mais à un temps plus tardif (6 jours post-infection et non plus 3 jours post-infection)[353,361,380]. Ce retard suggère que la colonisation du SNC murin par le RVFV n'est pas liée à un niveau de virémie minimal, mais que cette colonisation est potentiellement majorée par la phase hépatique. Il est donc possible que la cinétique de neuroinvasion du RVFV soit corrélée à la charge virale, comme ceci est souvent décrit dans la pathogénèse globale du RVFV[341,362,376]. Il serait alors intéressant de tester l'influence d'une gamme de MOI sur la cinétique de neuroinvasion du RVFV et à plus long terme, de déterminer si certains niveaux de virémie pourraient être corrélés avec une invasion plus précoce du SNC, conduisant alors à une manifestation plus rapide des symptômes neurologiques.

De plus, il semble cohérent que la BHE humaine ne soit pas déstabilisée dans les temps précoces de l'infection. En effet, chez le modèle rongeur, les formes neurologiques sont accompagnées d'hémorragies cérébrales, ce qui suggère une atteinte de l'arbre neurovasculaire et une perte d'intégrité de la BHE conduisant au passage du sang contenu dans les vaisseaux sanguins vers le SNC[353]. Or, chez l'Homme, la description d'hémorragies cérébrales lors des formes neurologiques de FVR est très rare, suggérant que l'atteinte de la BHE ne conduit pas à une telle déstabilisation de l'arbre neurovasculaire[214,462,465,466]. Corrélée à une augmentation du titre viral, on observe chez le rongeur une ouverture tardive de la BHE (5 à 8 jours post-infection) accompagnée d'hémorragies cérébrales et d'une surexpression de l'enzyme MMP9[353,357]. MMP9 est une collagénase de type IV sécrétée par les neurones, les cellules gliales, les leucocytes périphériques recrutés et la BHE. Les MMP9 sont sécrétée sous forme

inactive, et certains facteurs cellulaires (autres MMP, tPA) ou des modifications post-traductionnelles vont conduire à leur activation. L'une des fonctions des MMP9 est de dégrader la membrane basale de la BHE afin de faciliter la transmigration leucocytaire. De plus, la présence de cytokines et chimiokines dans un contexte inflammatoire telles que CCL2, CCL5 ou IL-8 va conduire à une surexpression de MMP9 par les cellules du SNC. Ainsi, un contexte de neuroinflammation peut conduire à une surexpression de MMP9 et donc à une altération de l'intégrité de la BHE[490–492]. La surexpression de MMP9 et la déstabilisation de l'intégrité de la BHE participent à la neuroinvasion virale en facilitant la paracytose des particules virales, comme ceci à été décrit lors de l'infection par WNV[142,493,494]. Les résultats de ce travail de thèse ont montré que, malgré l'augmentation du titre viral suite à l'infection par le RVFV de la BHE et des cellules adjacentes (astrocytes, péricytes), aucune surexpression de facteur solubles inflammatoires favorisant la diminution de l'intégrité de la BHE (IL-6, TNFα), ni de métalloprotéases (MMP9, MMP2) ni de déstabilisation de l'intégrité de la BHE n'ont été observées[54,62,67]. Probablement dû à une réponse inflammatoire différente, ces résultats *in vitro* suggèrent une résistance accrue de la BHE humaine par rapport à la BHE des rongeurs suite à l'infection par le RVFV. Cependant, les formes neurologiques de RVFV se manifestent à des temps plus précoces chez les rongeurs que chez l'Homme (8 jours contre 1 à 4 semaines, respectivement)[214,353]. Il se pourrait donc qu'une atteinte de l'intégrité de la BHE se manifeste à un stade plus tardif chez l'Homme. Il est donc nécessaire d'effectuer ces analyses d'intégrité à des temps plus tardifs que ceux analysés ici (soit >7 jours post-infection). Néanmoins, il ne semble plus avoir de réplication significative du RVFV après 3 jours post-infection de la BHE. Etant donné que l'ouverture de la BHE et la sécrétion de MMP9 sont corrélées à la charge virale, cette absence de réplication du RVFV après 3 jours post-infection suggèrent que même à des stades tardifs, l'infection de la BHE humaine seule n'est probablement pas responsable d'une augmentation de sa perméabilité.

Ce travail a conduit à la description d'un mécanisme cellulaire de la BHE potentiellement responsable de l'élimination progressive des cellules infectées par le RVFV sans atteinte des jonctions serrées. Ce mécanisme pourrait également éliminer une origine virale directe dans la déstabilisation de la BHE. Ce mécanisme semble proche de celui décrit pour l'extrusion des cellules épithéliales de l'intestin lors du renouvellement cellulaire de la barrière intestinale[495–497]. Ce mécanisme naturel de maintenance permet aux barrières cellulaires hautement dynamiques de se renouveler suite à une atteinte de la viabilité des cellules, d'origine physiologique ou pathologique, tout en maintenant leurs fonctions barrières cruciales. Ce mécanisme est lié à un maintien de l'expression de jonctions serrées entre la face basale de la cellule éliminée et ses cellules voisines : un remodelage dynamique de ces jonctions serrées va conduire à l'élimination progressive de la cellule en scellant l'espace extracellulaire jusqu'à ce que l'extrusion soit complète[497]. Etant une barrière cellulaire cruciale et en contact avec un compartiment dont les conditions physico-chimiques sont très dynamiques, il semblerait cohérent que la BHE soit également capable de mettre en place ce mécanisme de renouvellement cellulaire lors de l'élimination de cellules apoptotiques telles que des cellules infectées. Cependant, ce mécanisme n'a jamais été décrit pour la BHE et nécessite d'être exploré davantage. Toutefois, d'autres auteurs utilisant un modèle *in vitro* similaire à celui présenté dans ce travail de thèse ont montré que le traitement cytotoxique de la BHE avec des

composés organophosphorés entrainait un mécanisme d'élimination des cellules apoptotiques différent : après traitement, les cellules en apoptose montrent une atténuation de l'expression des jonctions serrées mais ont un volume cellulaire plus important afin de limiter le développement des interstices paracellulaires[498]. Ainsi, il se pourrait que les mécanismes d'éliminations des cellules endothéliales de la BHE soient dépendants de la nature du composé cytotoxique et des voies de morts cellulaires mises en place. Néanmoins, cette élimination progressive des cellules apoptotiques suggère que l'infection directe de la BHE par le RVFV n'induit pas son ouverture d'origine lytique, comme ceci a pu être décrit pour d'autres virus tel que le NiV, mais plutôt par la mise en place d'une neuroinflammation tardive décrite comme majorant l'ouverture de la BHE[134,189,499].

Certains auteurs ont fait l'hypothèse que cette neuroinflammation se visualiserait par une inflammation de l'arbre neurovasculaire, mais son origine reste toutefois discutée[466]. Ces auteurs ont observés par imagerie médicale une inflammation des vaisseaux sanguins du SNC humain et ont fait l'hypothèse d'une origine virale directe dans cette vascularite observée au cours d'une forme neurologique de la FVR, mais cela reste inexploré[466]. D'autres auteurs ont également décrit la surexpression de marqueurs d'activation endothéliale systémique dans les échantillons sanguins corrélée à la charge virale dans les formes sévères de FVR (E-Selectine, thrombomoduline, ICAM)[341,342]. La surexpression de ces marqueurs est d'ailleurs un indicateur classique des fièvres hémorragiques virales telles que lors des hémorragies au cours de l'infection par EBOV[500,501]. Cependant, ces marqueurs reflètent l'atteinte de l'endothélium vasculaire périphérique dans les formes hémorragiques et ne reflète donc pas spécifiquement une atteinte de la neurovascularisation. Etant donné que le RVFV est potentiellement capable d'infecter les endothéliums vasculaires périphériques, il se peut que la surexpression de ces marqueurs ne reflète pas une vascularite de la neurovascularisation et il semble donc nécessaire de l'explorer plus en détails dans les formes neurologiques de FVR[366]. Néanmoins, la surexpression de ces marqueurs est synonyme d'une perméabilité accrue des endothéliums vasculaires de façon générale et d'un recrutement accru des leucocytes, comme retrouvés dans les formes neurologiques humaines de FVR[154,502]. Les résultats de ce travail de thèse ont pu confirmer que le RVFV infecte bien l'endothélium de la BHE humaine sans induire de surexpression de ces marqueurs (E-Selectine et ICAM) ni une augmentation de sa perméabilité et du recrutement de leucocytes. De plus, l'infection de la BHE par le RVFV conduit également à la mise en place d'une réponse inflammatoire et d'une réponse IFN de type I/III, modérée et polarisée vers le pôle apical, qui sont décrites comme diminuant la perméabilité de la BHE et limitant la réplication du RVFV ainsi que la neuroinvasion d'autres virus tels que WNV ou JEV[168,178,179,369,481,503]. Néanmoins, il se pourrait que l'augmentation de ces marqueurs soit nettement plus tardive et seulement après la mise en place d'une neuroinflammation déstabilisant la BHE. L'ensemble de ces résultats montre que la BHE mets en place différents mécanismes pour contrôler son infection par le RVFV et maintenir son intégrité : réponse immunitaire limitant le RVFV sans être délétère pour son intégrité (pas de surexpression de MMP9, réponse inflammatoire modérée et polarisée, pas de majoration du recrutement des leucocytes) et élimination progressive des cellules infectées. De ce fait, l'atteinte probablement plus modérée de la BHE humaine semble être d'origine inflammatoire à un stade tardif de l'infection du SNC plutôt que d'origine virale dans la phase précoce de l'infection.

Pour finir, l'intégrité de la BHE est soutenue par une organisation cellulaire complexe appelée la NVU[78]. Etant donné que l'ouverture de la BHE semble liée à la neuroinflammation plutôt que directement à l'activité lytique directe du RVFV, il est nécessaire d'établir si d'autres acteurs de la NVU pourraient majorer cet effet sur la BHE humaine, nous rapprochant alors davantage des conditions *in vivo*. En effet, il a été démontré que la régulation de l'intégrité de la BHE ainsi que la mise en place et régulation de la réponse immunitaire étaient médiées par les différentes actions complémentaires des acteurs de la NVU : péricytes, astrocytes, microglies, neurones, oligodendrocytes, *etc*. Il serait donc intéressant de définir le rôle et les interactions des différentes acteurs de la NVU, et notamment les acteurs de l'interface gliovasculaire (astrocytes, péricytes) ou les acteurs immunitaires majeurs (astrocytes, microglies), dans la mise en place de la neuroinflammation et dans la déstabilisation de l'intégrité de la BHE[62,88,504]. Les résultats de ces travaux de thèse ont montré que les astrocytes et les péricytes infectés ne semblent pas augmenter l'expression de facteurs solubles et/ou immunitaires pouvant altérer cette intégrité. Cependant, le modèle de BHE utilisé ne permet pas la formation des pieds astrocytaires : il faudrait donc explorer si l'infection des astrocytes peut déstabiliser la BHE par la perte de cette connexion physique.

II. Facteurs d'origine virale pouvant influencer la neuroinvasion du RVFV

Au vu des résultats obtenus, il s'avère probable que certains facteurs d'origine virale puissent influencer la neurovirulence du RVFV. En effet, les résultats de ce travail de thèse semblent montrer l'existence d'un facteur souche dans la capacité de neuroinvasion du RVFV : la souche MRU25010-30 se réplique jusqu'à atteindre des titres plus élevés et accède au pôle basal de la BHE à des temps plus précoces comparé à la souche Mayotte 2008. Par ailleurs, la comparaison des résultats obtenus pour les 2 souches virulentes (MRU25010-30 et Mayotte 2008) avec ceux obtenus pour la souche atténuée Clone 13 (délétée en NSs), semble indiquer que la neuroinvasion directe par l'infection des cellules endothéliales ne soit pas un mécanisme NSs-dépendant : la souche virale Clone 13 arbore des caractéristiques de neuroinvasion similaires à la souche virale la plus virulente (MRU25010-30) dans les étapes précoces de la neuroinvasion. Certains auteurs ont également démontrés que l'absence de NSs n'empêche pas d'accéder au SNC après infection par aérosols chez le rongeur, confirmant que le facteur de virulence NSs n'est pas impliqué dans les étapes précoces de neuroinvasion[459,460]. De même, il a été démontré que le Clone 13 délété en NSs est capable de traverser une autre barrière cellulaire chez le modèle ovin, la barrière placentaire, suggérant alors que la protéine virale NSs n'est pas impliquée dans les capacités directes d'invasion du RVFV[395]. Toutefois, lors de l'infection périphérique de rongeurs (voie sous-cutanée ou intra-péritonéale), il a été démontré que le déclenchement des formes neurologiques est dépendant de l'inhibition par NSs de la réponse immunitaire périphérique (réponse naturelle, anticorps neutralisants), permettant alors la dissémination du RVFV dans l'organisme jusqu'à atteindre le SNC et aboutissant à la neuropathogénèse. En l'absence de cette inhibition, les hôtes infectés semblent lutter efficacement contre l'infection virale et ne déclenchent pas de formes neurologiques[379,429,431,459,463,464]. Les résultats de ce travail de thèse montrent également qu'en l'absence de NSs, la réplication du Clone 13 semble inhibée plus rapidement comparativement aux infections par les autres souches, suggérant alors que l'inhibition par NSs de la réponse

immunitaire est nécessaire au RVFV pour maintenir sa réplication et persister dans le SNC. En effet, chez le rongeur, il a également été démontré qu'en l'absence de NSs, l'injection intra-crânial de faibles doses de RVFV n'induit pas de pathologie neurologique, confirmant que NSs est nécessaire à la neuropathogénèse du RVFV[447]. Ainsi, il semblerait que NSs soit indirectement nécessaire à la neuroinvasion : son absence n'altère pas l'infection précoce des cellules endothéliales, mais permet la mise en place d'une réponse immunitaire, soit en périphérie dans les phases précoces ou soit dans le SNC, ce qui limiterai la capacité du RVFV à se répliquer et donc sa neurovirulence. De même, en l'absence de NSs, il semblerait que la BHE induise une réponse immunitaire accrue pouvant conduire à un recrutement plus important de cellules immunitaires vers le SNC et limiter davantage la réplication du RVFV.

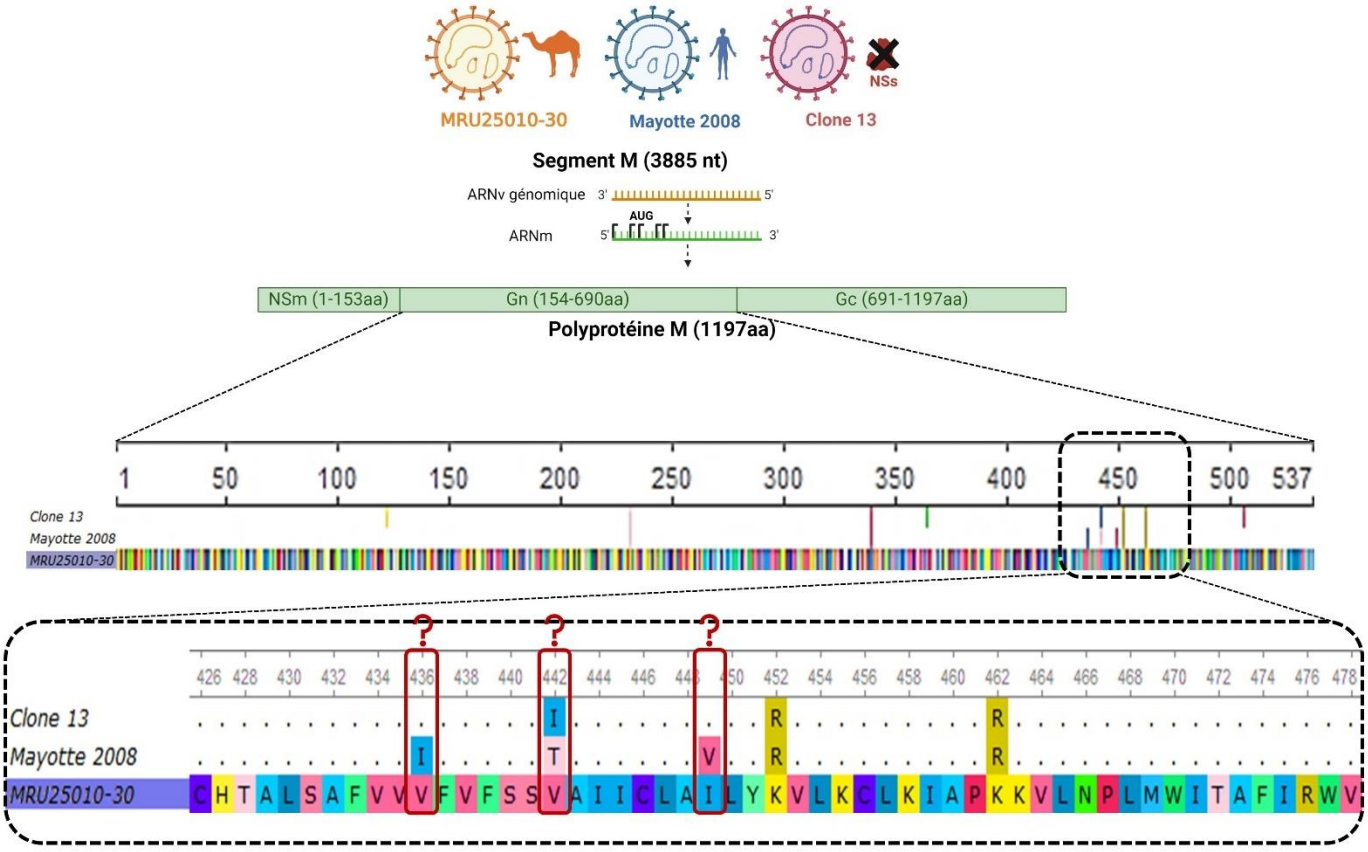


Figure 29 : Comparaison *in sillico* de séquences protéiques de la protéine de surface Gn de 3 souches de RVFV. A partir des séquences nucléotidiques du segment M des souches MRU25010-30 (OR844391.1), Mayotte 2008 (DQ380213.1) et Clone 13 (HE687303.1), la séquence protéique de chaque polyprotéine M a été déterminée *in sillico* (ORFinder, NCBI). Les séquences putatives de la protéine Gn de la souche Mayotte 2008 et Clone 13 ont ensuite été alignées avec celle de la souche MRU25010-30. Les points d'interrogations représentent les mutations spécifiques de la protéine putative Gn des souches Mayotte 2008 et Clone 13 comparées à celle de la souche MRU25010-30. (nt : nucléotide, aa : acide aminé)

Au cours de ce travail de thèse, il a également été démontré que la réponse immunitaire mise en place par la BHE suite à l'infection par les souches MRU25010-30 et Mayotte 2008 est similaire. Au vu de l'ensemble de ces informations, le facteur de virulence NSs ne semble donc pas expliquer le facteur d'origine virale responsable de la différence de neuroinvasion observée entre les souches Mayotte 2008, MRU25010-30 et Clone 13. Cette différence de neuroinvasion pourrait être associée soit au facteur de virulence NSm, parfois décrit comme influençant la virulence des souches de RVFV, soit à la protéine de surface Gn responsable de

l'interaction avec le récepteur cellulaire et l'internalisation du RVFV[321,505,506]. En effet, les mutations des protéines de surface sont parfois associées à une variation du tropisme cellulaire ou de la virulence des souches : par exemple, il a été démontré qu'une seule mutation de la séquence protéique de la protéine d'enveloppe E2 du CHIKV atténuait sa neurovirulence[507]. Ainsi, les séquences protéiques putatives des polyprotéines M de chaque souche ont été déterminées à partir de la séquence nucléotidique du segment M (ORFinder, NCBI, MRU25010-30 (OR844391.1), Mayotte 2008 (HE687303.1) et Clone 13 (DQ380213.1)). Ces séquences protéiques putatives ont ensuite été alignées (CLUSTALW, Unipro UGENE v45.0) pour explorer la présence de mutations non-silencieuses. Comparée à celle de la souche MRU25010-30, la polyprotéine M du Clone 13 a 11 mutations non-silencieuses (99,08% d'identité de séquences) et celle de Mayotte 2008 possède 14 mutations non-silencieuses (98,83% d'identité de séquences) (Figure 29).

Lorsque l'on compare seulement la séquence correspondant à la protéine putative Gn, le Clone 13 a 8 mutations non-silencieuses et Mayotte 2008 en a 7 (Figure 29). De façon intéressante, les souches Clone 13 et Mayotte 2008 possèdent la mutation K384T, récemment décrite comme réduisant la virulence des souches de RVFV[508]. Ainsi, une première piste de différence de neuroinvasion entre les souches Mayotte 2008 et MRU25010-30 pourrait résider dans la présence de cette mutation spécifique. Cependant, étant donné que le Clone 13 possède également cette mutation et que sa capacité de neuroinvasion est similaire à celle de MRU25010-30 dans les temps précoces, il semble alors que cette mutation ne soit pas spécifiquement impliquée dans l'infection des cellules endothéliales de la BHE. De ce fait, cibler la comparaison sur des mutations de la protéine Gn spécifique à la souche Mayotte 2008 permet de définir certains candidats : V436I, I449V et potentiellement V442T (Figure 29). Le résidu 442 est également muté dans la souche Clone 13 (V442I), faisant de la mutation de ce résidu une mutation non-spécifique à la souche Mayotte 2008. Ainsi, il serait intéressant de voir si les mutations V436I et I449V de la protéine Gn peuvent être impliquées dans une neuroinvasion plus importante de la souche de RVFV, par la génération de recombinants par génétique inverse par exemple. De même, par comparaison des séquences protéiques putatives correspondantes à la protéine NSm (1-153aa), 2 mutations non-silencieuses spécifiques de la souche Mayotte 2008 ont pu être identifiées : I60V et D95N. Tout comme les mutations précédentes, il serait intéressant d'explorer la potentielle influence de ces mutations sur la neuroinvasion des souches de RVFV. Définir des motifs spécifiques de neurovirulence sur les séquences virales de RVFV permettrait d'établir des outils de prédiction sur la capacité de neuroinvasion d'une souche sur le terrain et ainsi anticiper les formes neurologiques lors des épidémies.

III. Neuroinvasion par infection directe des autres barrières cellulaires du SNC accessibles par la voie hématogène

Le potentiel rôle de la voie hématogène dans la neuroinvasion du RVFV, et notamment pour atteindre le SNC en franchissant la BHE, a pu être démontré par ces travaux de thèse. Cependant, d'autres barrières cellulaires vont réguler les échanges entre le compartiment sanguin et le SNC[509]. Suite à l'augmentation de la virémie par la phase hépatique, il se peut que la voie hématogène favorise la dissémination du RVFV jusqu'aux différentes barrières du

SNC[348,353]. Les résultats de ces travaux ont confirmé la permissivité des cellules endothéliales de la BHE à l'infection par le RVFV, mais le récepteur impliqué n'a pas été exploré. Il serait intéressant de d'identifier et caractériser ce récepteur afin de déterminer théoriquement la permissivité des autres barrières cellulaires en fonction de leurs récepteurs. Il a par exemple été déterminé que certains composants des complexes de jonctions intercellulaires pouvaient être utilisés par certains virus afin d'infecter ces barrières cellulaires telle que l'occludine pour le HCV[510,511]. Cela permettrait donc de définir la permissivité des différentes barrières cellulaires en fonction de la composition de leurs complexes de jonctions. Toutefois, le rôle de LRP1 est essentiel dans la pathogénèse du RVFV et les cellules endothéliales de la BHE expriment LRP1, faisant de ce dernier un récepteur potentiel[512,513]. Le récepteur LRP1 est décrit comme ubiquitaire et serait exprimé par de nombreuses cellules endothéliales, notamment pour son rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie des différents tissus[514]. De ce fait, il se pourrait que les différentes barrières cellulaires du SNC soient également permissives à l'infection par le RVFV et puissent participer à la neuroinvasion par le RVFV.

Tout d'abord, la barrière sang-nerf (BSN) est la barrière qui va réguler les échanges entre le sang et les axones présents dans les nerfs. Ces axones sont protégés dans un espace qualifié d'endoneurial, délimité par les fibroblastes du perineurium, et irrigué par ses propres vaisseaux sanguins arborant une permissivité sélective similaire à celle de la BHE[515]. Cet endothélium endoneurial et le perineurium forment la BSN. Chez le modèle rongeur infecté par le RVFV, la présence d'antigènes viraux dans les fibroblastes du perineurium, ainsi que la présence d'ARN viral dans plusieurs nerfs, ont été montrées et suggèrent la présence du virus dans les nerfs périphériques[353,380]. Cependant, ce point reste très peu caractérisé : l'infection des fibroblastes du perineurium peut avoir lieu suite à l'infection du nerf par les vaisseaux sanguins irriguant l'épineurium, espace extérieur au perineurium, ou suite à l'invasion de l'espace endoneurial après avoir traversé l'endothélium endoneurial. Ainsi, il semblerait que les nerfs soient potentiellement infectés par le RVFV, mais sa capacité à accéder aux nerfs et à traverser la BSN restent encore à élucider. Pour cela, certains auteurs ont mis en place des modèles *in vitro* de BSN à l'aide de cellules endothéliales endoneuriales primaires ou immortalisées humaines arborant une sélectivité proche de la BSN *in vivo,* ou à l'aide de culture primaire de fibroblastes humains du perineurium[516–518]. Ces mêmes auteurs décrivent que l'acquisition de ces caractéristiques spécifiques pourrait être majorée par la co-incubation de ces cellules endothéliales avec des cellules de Schwann ou des péricytes spécifiques des vaisseaux sanguins endoneuriales, mais l'impact de cette co-incubation reste très peu caractérisée[517,519,520]. Il a également été démontré que les fibroblastes du perineurium exprimaient LRP1, suggérant alors qu'ils soient potentiellement permissifs à l'infection par le RVFV, ce qui justifierait la présence d'antigènes viraux dans cet espace chez la souris[521,522]. Peu caractérisée, la présence de LRP1 sur les cellules endothéliales endoneuriales reste à investiguer tout comme la capacité du RVFV à les infecter. Ainsi, plusieurs éléments sont en faveur de la capacité du RVFV à accéder aux nerfs par la voie hématogène, conduisant au franchissement potentiel de la BSN par l'infection des fibroblastes du perineurium, mais restent à confirmer.

L'accès au SNC par le LCR pourrait également être une voie d'entrée du RVFV. Au même titre que la BHE, la barrière sang-LCR (BSLCR) est décrite comme une voie d'entrée importante dans la neuroinvasion de nombreux virus neurotropes tels que le SARS-CoV-2,

CMV, NPEV, MuV ou encore le CHIVK[146,499,523,524]. Pour cela, le RVFV doit traverser la BSLCR en infectant les cellules épithéliales du plexus choroïde. Il a également été démontré que ces cellules épithéliales exprimaient le récepteur LRP1, suggérant une potentielle permissivité de ces cellules à l'infection par le RVFV[525,526]. Néanmoins, la présence de particules virales ainsi que d'ARN viraux dans le LCR est un point peu étudié et nécessitant plus d'explorations, notamment sur leurs prévalences dans les formes neurologiques et leurs impacts sur la neuropathogénèse. Il a été décrit que le RVFV n'est pas présent dans le LCR de singes infectés, suggérant que la présence du virus dans le LCR est soit très rare, soit spécifique aux formes humaines[355,382]. Etant donné la détection du RVFV dans le LCR, la présence de LRP1 sur les cellules épithéliales du plexus choroïde et le déclenchement de méningites lors des formes neurologiques, il serait très intéressant de définir si le RVFV est capable de traverser cette barrière cellulaire du SNC. Plusieurs modèles *in vitro* utilisant des co-cultures de cellules endothéliales et de cellules épithéliales du plexus choroïde peuvent être utilisés dans l'étude de la neuroinvasion virale, tels que ceux utilisé dans l'étude de la neuroinvasion du SARS-CoV-2[146,527].

Pour finir, la dernière barrière que le RVFV pourrait rencontrer est la barrière sang-rétine (BSR), la double barrière cellulaire protégeant la rétine. Tout comme les précédentes barrières, l'épithélium rétinien pigmentaire ainsi que l'endothélium vasculaire de la rétine, composant la BSR externe et interne, expriment le récepteur LRP1, les rendant alors potentiellement permissifs à l'infection par le RVFV[528,529]. Cependant, cet aspect de la neuroinvasion du RVFV est très peu documenté et reste à explorer. Plusieurs virus tels que ZIKV ou SARS-CoV-2 sont capables de traverser ces deux barrières en infectant soit les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins rétiniens soit les cellules épithéliales rétiniennes pigmentaires[145,530,531]. De même, les formes oculaires sont, comme les formes neurologiques, des formes retardées de FVR se manifestant à des stades tardifs de l'infection (2 à 60 jours post-infection)[338]. Ainsi, dans une proportion variable mais importante des cas, les formes neurologiques de la FVR sont concomitantes au déclenchement d'une rétinite. L'œil est comme le SNC, un système biologique immunoprivilégié protégé par la BSR, mais les mécanismes d'invasion et de mort cellulaire de cet organe ne sont pas encore élucidés dans les formes sévères de FVR, avec des questions similaires aux formes neurologiques sur le rôle de l'inflammation, l'origine des dégâts cellulaires et les mécanismes d'invasion de l'œil[295,416]. De plus, cette forme est très peu caractérisée, notamment dû à l'absence de modèles animaux manifestant cette forme principalement retrouvée chez l'Homme. Cependant, il a été démontré récemment chez un modèle animal alternatif, le Zebrafish (*Danio rerio*), que le RVFV est capable d'infecter sa rétine ainsi que les nerfs optiques, faisant de ce modèle, avec certaines lignées de rat (Sprague Dawley), un modèle intéressant pour étudier le franchissement de la BSR par le RVFV, la pathogénèse oculaire et son rôle dans les formes oculaires et/ou neurologiques[532,533]. Ces aspects de la neuroinvasion du RVFV peuvent également être explorés à l'aide de modèle *in vitro* de BSR tels que ceux utilisés pour déterminer le franchissement de la BSR par le SARS-CoV-2 ou ZIKV[530,531].

IV. Autres mécanismes de neuroinvasion

Au cours de ces travaux de thèse, la capacité du RVFV à utiliser un des mécanismes de neuroinvasion par la voie hématogène a été confirmée, mais d'autres mécanismes sont décrits dans la voie hématogène ainsi que dans la voie non-hématogène. Tout d'abord, il serait intéressant de voir si le RVFV est capable d'utiliser d'autres mécanismes de la voie hématogène. Comme décrit précédemment, les virus sont capables de traverser la BHE par deux mécanismes de diffusion transcellulaire sans notion de réplication : la transcytose et la paracytose. Ces mécanismes sont décrits pour d'autres virus neurotropes tels que JEV, WNV ou encore ZIKV[134,534,535]. L'exploration de ces mécanismes n'a pas été effectuée lors de ce travail, mais le modèle de BHE *in vitro* utilisé aurait pu le permettre. En effet, l'utilisation de virus non-réplicatifs (délétion du segment L par exemple) ainsi que l'utilisation de certaines drogues permettant l'inhibition de la transcytose (la nystatine par exemple) auraient permis d'établir si le RVFV est capable de diffuser à travers la BHE sans réplication, soit en détournant la machinerie de sécrétion cellulaire comme le fait ZIKV (transcytose), soit en déstabilisant les échafaudages de jonctions serrées comme le fait WNV (paracytose)[164,534]. La transcytose du RVFV semble probable, notamment par son interaction avec des récepteurs cellulaires tel que LRP1, et nécessite d'être explorée plus en détails. En revanche, la paracytose du RVFV, quant à elle, ne semble possible qu'à un stade plus tardif de l'infection et seulement si l'infection ou la neuroinflammation induisent une déstabilisation de l'intégrité de la BHE. En effet, l'organisation des protéines de jonctions serrées semble avoir été maintenue malgré l'infection par le RVFV. Ces résultats suggèrent donc que le RVFV n'a probablement pas pu diffuser par paracytose entre les cellules endothéliales : ni le virion ni l'infection de la BHE n'ont induit une déstabilisation de ces échafaudages protéiques limitant la diffusion paracellulaire passive. Il semblerait intéressant de confirmer ces conclusions et ces hypothèses en explorant ces deux mécanismes, confirmant ou infirmant alors la nécessité du RVFV à devoir se répliquer après l'infection de la BHE pour pouvoir accéder au SNC.

De même, il a longtemps été suggéré que le RVFV soit capable d'accéder au SNC par le mécanisme de cheval de Troie[295]. Le RVFV étant capable d'infecter une large gamme de cellules humaines, dont des leucocytes ayant une capacité naturelle de transmigration à travers la BHE, il semble alors possible que l'infection de ces cellules puisse permettre ce mécanisme précis de neuroinvasion. Cependant, les résultats préliminaires de ce travail, bien que limités, ne vont pas dans ce sens : les cellules dendritiques infectées par le RVFV ne semblent pas avoir une capacité de transmigration accrue, comme il est décrit lors de l'infection par WNV ou USUV. Ces résultats suggèrent alors que l'infection de ces cellules ne favorise pas la mise en place d'un mécanisme de cheval de Troie[142]. Ces résultats restent préliminaires et nécessitent davantage d'exploration avec une méthodologie plus robuste et diversifiée : diversité des types cellulaires potentiellement impliqués (macrophages, lymphocytes, neutrophiles, monocytes) et diversité des approches (marqueurs cellulaires, pore de filtre plus large, *etc.*). Plusieurs conclusions issues de la littérature semblent également indiquer que le mécanisme de cheval de Troie n'est probablement pas un mécanisme essentiel de la neuroinvasion du RVFV. Plusieurs auteurs ont mis en évidence que l'infection des cellules, et notamment via l'action de NSs, altérait la transcription de nombreux gènes, dont certains impliqués dans l'adhésion cellulaire et modulerait le cytosquelette d'actine. Ces deux actions de NSs pourraient alors conduire à une

réduction de la mobilité cellulaire et des capacités d'adhésion cellules-cellules[449,458]. Ces résultats suggèrent donc que NSs inhiberait chez les cellules infectées leur capacité de transmigration permettant le mécanisme de cheval de Troie. Par ailleurs, ces résultats préliminaires montrent également que l'infection par la souche de RVFV délétée en NSs n'induit pas non plus une augmentation de l'adhésion à la BHE des cellules dendritiques. Pour finir, lors de l'infiltration leucocytaire dans le SNC de primates non-humains (PNH) manifestant une forme neurologique, aucun lymphocytes présents dans le SNC n'étaient infectés[355]. L'ensemble de ces connaissances et de ces données préliminaires suggèrent donc que le mécanisme de cheval de Troie, potentiellement inhibée par NSs, ne semble pas être un mécanisme de neuroinvasion privilégié par le RVFV, mais ceci reste toutefois à explorer plus en détails et à confirmer.

Pour finir, la voie non-hématogène semblerait également jouer un rôle important et reste une des hypothèses les plus soutenues dans la neuroinvasion du RVFV[353,363]. Etant donné que le RVFV est capable d'infecter chez les rongeurs les neurones et les nerfs présents dans l'épithélium olfactif, ou dans d'autres compartiments périphériques, il est probable que le RVFV soit capable d'utiliser la machinerie de transport axonal rétrograde pour accéder au SNC. Ce mécanisme, décrit pour de nombreux virus tels que WNV, TBEV, HSV-1 ou encore RABV, pourrait en effet constituer un mécanisme possible de neuroinvasion du RVFV : l'infection par aérosols majore la sévérité et la rapidité des formes neurologiques, suggérant donc que l'invasion du SNC est plus efficace et/ou plus précoce[172,358,536,537]. Cette hypothèse est également transposable chez l'Homme, étant donné qul'une des voies majoritaires d'infection est par aérosols, mais l'impact de cette voie de transmission sur les formes neurologiques humaines n'a jamais été exploré[416]. De plus, il a été décrit que les formes neurologiques sont concomitantes avec les manifestations oculaires humaines de FVR[214,338]. Etant un compartiment innervé par le nerf optique, il se pourrait également que les aérosols conduisent à l'infection de l'œil puis de la rétine après avoir traversé la BSR, ce qui permettrait alors un transport axonal rétrograde du RVFV à partir du nerf optique vers le SNC. Cela majorerait alors les capacités de neuroinvasion du RVFV suite à une infection par aérosols. Cependant, il a été montré, chez le Zebrafish, que l'infection de l'œil ne conduit pas à la colonisation du SNC par le RVFV[532]. Cette conclusion suggère donc que les manifestations ophtalmiques tardives du RVFV seraient davantage dues à une colonisation tardive de l'œil, comme le SNC, et que l'œil ne représente donc pas un compartiment intermédiaire permettant d'accéder au SNC, mais ceci reste à confirmer. Malgré que l'infection des neurones et des nerfs ait été confirmée chez le modèle rongeur, notamment pour les nerfs crâniens, la capacité du RVFV à détourner la machinerie de transport cellulaire de l'axone afin d'accéder au corps cellulaire présent dans le SNC n'a pas encore été confirmée et reste incertaine. Certains éléments sont en faveur de ce mécanisme : infection des neurones, aérosols majorant les formes neurologiques, moelle épinière présentant une atteinte majeure et précoce comparée à l'encéphale, présence d'ARN viraux dans les nerfs, présence d'antigènes viraux dans les cellules perineuriales de la BSN. Cependant, certains auteurs ont démontré qu'aucune particule virale n'est présente dans les axones et les dendrites des neurones infectés, ce qui semble cohérent au vu de l'entrée cellulaire par fusion de la membrane du virion[366]. Cela suggère donc que le mécanisme de transport axonal est potentiellement médié par les RNP, et non pas par la particule virale ou l'endosome contenant la particule[538]. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si les neurones humains sont permissifs à l'infection par le RVFV et si les RNP libérés dans les axones infectés peuvent détourner la machinerie de transport cellulaire par interaction entre la dynéine axonale et la

protéine structurale N par exemple[134]. Cependant, d'autres auteurs ont défini que la concentration d'ARN viraux dans les axones des nerfs périphériques (nerfs sciatiques) restait faible et stable au cours du temps, et ont donc suggéré que ce mécanisme ne serait pas un mécanisme de neuroinvasion du RVFV[361,380]. Ainsi, malgré que ce mécanisme de neuroinvasion soit très probable, il reste toutefois plusieurs caractéristiques à confirmer et à préciser : est-il spécifique aux nerfs olfactifs et/ou oculaires ? est-il un mécanisme de neuroinvasion majorant les formes neurologiques chez l'Homme ? Afin d'explorer ces questions, il serait intéressant de visualiser l'infection des axones par le RVFV et d'analyser les mécanismes moléculaires permettant ou non au RVFV un transport axonal rétrograde. Pour cela, les modèles *in vivo* d'animaux (rongeurs) ou alternatifs (Zebrafish) pourraient être utilisés, tout comme des modèles *in vitro* murins et humains permettant une compartimentation des neurones primaires en séparant le corps cellulaire des axones comme les chambres microfluidiques. Ce type de modèle facilite l'étude et la visualisation, par microscopie à fluorescence par exemple, du transport axonal rétrograde de particules virales ou de RNP[538,539].

Neurotropisme du RVFV et neuroinflammation

I. Neurotropisme, récepteurs cellulaires et facteurs cellulaires de résistance

Au cours de ces travaux, le neurotropisme humain du RVFV, c'est-à-dire sa capacité à effectuer son cycle de réplication complet dans des cellules neurales (neurones, cellules gliales), a pu être confirmé *in vitro*[94,123]. Notamment, la permissivité des astrocytes à l'infection par le RVFV a pu être démontrée, ce qui apporte des pistes de réflexion intéressantes sur le neurotropisme du RVFV. En effet, les astrocytes étant des cellules clés dans le maintien de l'homéostasie du SNC, ce neurotropisme pourrait expliquer le développement d'une pathologie d'ordre neurologique chez l'Homme[37,180,471]. Ces résultats transposent également certaines conclusions obtenues chez le modèle murin : les astrocytes humains sont permissifs à l'infection par le RVFV avec une réplication virale importante, ce qui corrobore avec la description des cellules gliales comme un réservoir cellulaire majeur du RVFV dans le SNC[366]. De nombreux types cellulaires du SNC ont été décrits comme permissifs à l'infection par le RVFV chez le modèle murin. Il convient donc de confirmer ces conclusions chez l'Homme par cette même approche *in vitro* à l'aide de cellules humaines primaires telles que des neurones, des microglies ou des oligodendrocytes. En effet, il est décrit chez le modèle rongeur que le RVFV est capable d'infecter les microglies et les neurones, mais jamais les oligodendrocytes, ce qui pourrait être intéressant pour définir l'impact de l'infection sur les différentes fonctions associées aux différentes cellules du SNC. Cependant, les approches *in vitro* ne permettent pas d'extrapoler avec certitude les conclusions de ce travail à l'échelle biologique chez l'Homme. En effet, ces approches ne permettent pas de simuler l'ensemble des interactions cellulaires dans le SNC qui peuvent, en plus de la permissivité propre à chaque type cellulaire, moduler la capacité du RVFV à infecter les différents types cellulaires. Il a par exemple été montré chez le modèle murin que le neurotropisme et la susceptibilité cellulaire du LGTV est dépendante de la communication intercellulaire, et que les conclusions peuvent différer entre les études *in vitro* et *in vivo*[540]. De ce fait, il parait plus cohérent de définir le neurotropisme comme la capacité d'un virus à infecter des cellules neurales dans des conditions *in vivo*. De plus, le RVFV est décrit comme pouvant coloniser l'ensemble des différents compartiments du SNC, suggérant

un neurotropisme très large, contrairement au LGTV ou TBEV dont le neurotropisme *in vitro* est large, mais dont la colonisation du SNC est précise et localisée[131,353,537,540,541]. Ainsi, il semble important d'explorer le neurotropisme dans des conditions biologiques pour évaluer la capacité du virus à se disséminer dans les différents compartiments du SNC, pouvant alors apporter certains liens entre neuropathogénèse et manifestations cliniques.

Il a été montré chez le modèle murin que toutes les cellules du SNC, sauf les oligodendrocytes, expriment à différents niveaux le récepteur LRP1[542]. Etant donné que LRP1 est un récepteur associé fortement à la pathogénèse du RVFV et pouvant justifier son large tropisme cellulaire, il semble donc important d'explorer la permissivité de chaque type cellulaire du SNC ainsi que l'implication du récepteur LRP1. Cette exploration permettrait de continuer de caractériser le rôle central de LRP1 dans le tropisme cellulaire du RVFV. En effet, étant donné que le récepteur LRP1 n'est pas présent à la surface des oligodendrocytes chez le modèle murin, et que les oligodendrocytes ne sont pas décrits comme permissifs à l'infection par le RVFV, il semble probable que LRP1 soit également impliqué dans le neurotropisme du RVFV. Cependant, au cours de ce travail, l'implication du LRP1 dans l'infection des astrocytes n'a pas pu être démontrée. Etant des données préliminaires, il se pourrait qu'un défaut technique ou méthodologique ait entrainé de fausses conclusions, cette exploration reste donc à poursuivre. Toutefois, ces résultats préliminaires peuvent également suggérer qu'un autre récepteur pourrait être impliqué dans l'internalisation du RVFV dans les astrocytes, et notamment le récepteur AXL[483,486,543]. En effet, ce récepteur transmembranaire à tyrosine kinase appartenant à la famille des TAM est également exprimé de façon ubiquitaire sur de nombreux types cellulaires (cellules dendritiques, rétiniennes, et neurales) et est très conservé entre l'Homme et les rongeurs. Ce récepteur est impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires dont l'inhibition de la réponse immunitaire et l'élimination des cellules apoptotiques. Ses ligands Gas6/Protéine S se lient spécifiquement aux phosphatidylsérines (PS) des cellules apoptotiques. Or, il a été démontré que l'enveloppe de certains virus enveloppés tels que le RVFV pouvait contenir des PS, interagir avec ses ligands et donc indirectement avec AXL dans le but d'inhiber la réponse immunitaire précoce des cellules infectées[544,545]. Ainsi, de nombreux virus utilisent AXL pour infecter différents types cellulaires, en tant que récepteur ou facteur d'attachement : DENV, SARS-CoV2, EBOV, ou bien encore ZIKV[546–549]. De plus, il a été démontré que ZIKV, un arbovirus dont le tropisme cellulaire possède des similitudes avec celui du RVFV (placenta, rétine, SNC, cellules immunitaires, reins), utilise surtout DC-SIGN pour infecter les cellules dendritiques alors que le récepteur ou facteur d'attachement majoritaire des cellules neurales est AXL[483,543,550]. De même, AXL a été décrit comme récepteur d'une autre fièvre hémorragique causée par un virus du même ordre que le RVFV (*Hareavirales*), le LASV[551]. Etant donné l'ensemble de ces informations et le tropisme cellulaire très large du RVFV, il est possible que d'autres récepteurs soient impliqués dans l'internalisation du RVFV tels que AXL.

Une permissivité variable en fonction du type cellulaire infecté a également été mise en avant : les péricytes répliquant moins le RVFV comparé aux astrocytes et aux cellules endothéliales. De même, les péricytes induisent peu ou pas de réponse immunitaire face à l'infection, les cellules endothéliales de la BHE induisent une réponse modérée et les astrocytes induisent une forte réponse immunitaire mais fortement inhibée par le facteur de virulence NSs

du RVFV. Et pour finir, seulement l'infection des astrocytes semble induire une mortalité cellulaire visualisable par une importante altération du tapis cellulaire. Ces résultats suggèrent alors que certains facteurs cellulaires, intrinsèques ou d'origine immunitaire, vont moduler la permissivité et la susceptibilité des cellules à l'infection par le RVFV. De même, comme défini précédemment, les astrocytes eux-mêmes représentent une population cellulaire très hétérogène (astrocytes protoplasmiques, astrocytes fibreux) et il serait intéressant de voir si cette hétérogénéité influence également la permissivité des astrocytes à l'infection par le RVFV, pouvant alors moduler la dissémination du RVFV dans le SNC. Cette différence de virulence en fonction du type cellulaire dans le SNC a été décrite pour d'autres virus neurotropes tels que USUV et ZIKV[483,552]. Ainsi, certaines protéines cellulaires, à ce jour encore non-décrites, et spécifiques de certains types cellulaires pourraient moduler cette permissivité : diversités et quantités des récepteurs cellulaires variables selon le type cellulaire (DC-SIGN, LRP1, *etc.*), présence de certains composants cellulaires majorant la réplication du virus (WDR7, UBR4, CK1, PP1) ou limitant la réplication du virus, comme ceux décrits dans la limitation de la réplication du IAV[37,270,282,542,553,554]. Il serait donc intéressant d'utiliser les méthodes de criblage moléculaire (CRISPR-Cas9, RNAi) sur ces différents types cellulaires afin de mettre en évidence les facteurs cellulaires spécifiques modulant cette permissivité à l'infection par le RVFV, comme il a pu être fait afin de définir certains facteurs comme le facteur WRD7 ou le récepteur LRP1[262,270].

II. Facteurs d'origine virale pouvant influencer la neurovirulence du RVFV

Dans la partie précédente, l'hypothèse d'un facteur cellulaire pouvant moduler la virulence du RVFV a été émise, mais il est également possible que celle-ci soit liée à un facteur viral. De ce fait, des mutations sur les séquences en acides aminés des différentes protéines du RVFV pourraient justifier cette variabilité dans la neurovirulence observée *in vitro* lors de l'infection des astrocytes. Toutes les protéines virales pourraient influencer la virulence de la souche, mais en se basant sur la littérature, 3 protéines du RVFV semblent plus importantes : les deux facteurs de virulence NSm et NSs, ainsi que la protéine de surface Gn modulant le tropisme du RVFV. Les mutations concernant les protéines NSm et Gn ont été abordés dans les parties précédentes et notamment par la description de 14 mutations non-silencieuses sur la polyprotéine putative M observées entre la souche MRU25010-30 et Mayotte 2008 (Figure 29). L'ensemble de ces mutations pourraient constituer des candidats intéressants pour étudier la différence de neurovirulence entre ces deux souches, et notamment la mutation K384T, déjà décrite comme influençant la virulence du RVFV[508].

Il serait également possible qu'une composante immunitaire module la neurovirulence du RVFV. Dans le sens de cette hypothèse, les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ont montré que la réponse immunitaire induite était plus importante et que les filaments nucléaires de NSs étaient de taille inférieure lors de l'infection des astrocytes par la souche Mayotte 2008 en comparaison de celle de la souche MRU25010-30. Ces travaux ont également démontré que la réponse immunitaire mise en place par les astrocytes, et notamment la réponse IFN, peut limiter efficacement la réplication du RVFV. Contrairement aux capacités de neuroinvasion, il semblerait donc que le facteur souche observé dans la différence de virulence soit lié à l'inhibition de la réponse immunitaire par le facteur de virulence NSs. Les séquences

protéiques putatives des protéines NSs de chaque souche ont été déterminées à partir de la séquence nucléotidique du segment S (ORFinder, NCBI, MRU25010-30 (OR844390.1), Mayotte 2008 (HE687302.1)). Ces séquences protéiques putatives ont ensuite été alignées (CLUSTALW, Unipro UGENE v45.0) pour explorer la présence de mutations non-silencieuses. Comparée à la protéine NSs de la souche MRU25010-30, la protéine NSs de la souche Mayotte 2008 possède 6 mutations non-silencieuses (97,74% d'identité de séquences). En se basant sur la base de données Uniprot (P21698), il s'avère que les différents domaines fonctionnels de NSs sont peu caractérisés. Il a également été décrit que les fonctions de NSs sont souvent liées à la structure globale de la protéine plutôt qu'à des résidus particuliers[555]. Cependant, d'autres auteurs ont mis en évidence qu'une mutation sur le résidu 261 pouvait entrainer une perte de filamentation des protéines NSs[556]. Or, par cet alignement de séquences, 2 mutations pourraient potentiellement, par leurs proximités avec le résidu 261, altérer les capacités de filamentation de la protéine NSs : les mutations V245I et E253G. Il serait donc intéressant de voir si ces mutations peuvent moduler la neurovirulence des souches de RVFV en altérant les fonctions de NSs, un facteur de virulence décrit comme essentiel dans la neuropathogénèse du RVFV[447].

Pour finir, l'origine de la souche pourrait également constituer un facteur de variabilité de la neurovirulence. Il a pu être montré par plusieurs études que les souches de RVFV amplifiées sur cellules de moustiques arboraient une virulence accrue comparé aux mêmes souches amplifiées sur cellules de mammifères (Vero)[323,325,418,426]. En effet, la nature des enveloppes lipidiques cellulaires et leurs composants vont différer en fonction des espèces. Ainsi, la nature de l'enveloppe virale va être dépendante de l'espèce ayant permis l'amplification et la formation de nouvelles particules virales. Or, les profils de glycosylation de l'enveloppe virale sont des facteurs essentiels dans la régulation de l'entrée et de la sortie cellulaire des virions par des mécanismes de répulsion/attraction, et peuvent donc influencer la virulence des souches de RVFV[557,558]. L'ensemble des souches utilisées au cours de ces travaux ont été amplifiées et produites sur cellules de mammifères (Vero). Il serait donc intéressant d'étudier si la production de ces mêmes souches virales sur cellules de moustiques, telles que les cellules C6/36, Aag2, ou U4.4, peut influencer la neurovirulence qui leur est associée et ainsi déterminer le rôle de l'espèce d'hôtes ayant permis l'amplification du RVFV[286]. De plus, on observe une différence de virulence entre la souche MRU25010-30, isolée chez le dromadaire, et la souche Mayotte 2008, isolée chez l'Homme. Les ruminants étant les hôtes nécessaires à l'amplification du RVFV permettant le passage à l'Homme et la transmission interhumaine n'ayant pas été décrite à ce jour, il se pourrait que l'effet de l'hôte mammifère duquel a été isolé la souche influence également la virulence de la souche, mais cela reste à explorer.

III. NSs et inhibition de l'export nucléaire des ARNm

Les différents rôles de NSs dans l'inhibition de la réponse immunitaire de la cellule infectée ont été très étudiés : inhibition des promoteurs de la réponse IFN, inhibition de la transcription cellulaire générale, inhibition de PKR, *etc*[275,279]. Certains auteurs ont également décrit une accumulation des ARNm dans les noyaux des cellules infectées, suggérant alors un

probable mécanisme d'inhibition de l'export nucléaire médié par les filaments nucléaires de NSs[455]. Mise à part cette étude, ce mécanisme n'a jamais été exploré plus précisément. Dans le même sens que cette étude, les résultats de ce travail ont montré que, malgré la surexpression importante des ARNm de la réponse immunitaire, les niveaux de cytokines et chimiokines sécrétées étaient fortement inhibés comparé à la condition infectée par la souche de RVFV délétée en NSs (Clone 13). Il est également décrit que la protéine cellulaire PKR inhibant la traduction des ARN viraux et cellulaires est inhibée par NSs, justifiant alors l'existence d'un autre mécanisme post-transcriptionnel empêchant la traduction de ces ARNm cellulaires. Au cours de ce travail de thèse, une accumulation nucléaire, variable en fonction de la souche, des ARNm de la réponse immunitaire a été confirmée et a pu apporter des arguments supplémentaires sur cet autre rôle de NSs peu décrit qui est l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm. Néanmoins, l'interaction entre NSs et les ARNm cellulaires ainsi que le mécanisme permettant cette séquestration ne sont pas encore élucidés.

Afin d'apporter quelques pistes sur cette interaction avec les ARNm cellulaires, une analyse *in sillico* des courts motifs linéaires présents sur la séquence de NSs a été réalisée. Les courts motifs linéaires (3 à 12 acides aminés) sont des régions continues modulant les interactions protéines-protéines qui sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires[559]. Certaines protéines virales miment ces motifs afin d'interagir avec les protéines cellulaires et ainsi détourner la machinerie cellulaire à leurs avantages. Ces interactions entre protéines de l'hôte et protéines virales peuvent être prédites *in sillico* par la présence de ces motifs[560–562]. La séquence de NSs a été analysée par l'outil prédictif de la banque de données ELM (Eukaryotic Linear Motif) et a permis de mettre en avant la présence d'un court motif linéaire sur la séquence de NSs pouvant justifier ce mécanisme d'inhibition[563]. La protéine NSs possède un motif spécifique reconnu comme une séquence d'export nucléaire : QRLVDLIGHMTLSD (position 87-100)[564]. Ce motif spécifique est reconnu par la protéine d'export nucléaire XPO1 (ou CRM1), impliquée dans de nombreux processus d'export de cargos cellulaires du noyau vers le cytoplasme cellulaire, tels que des protéines et différents types d'ARN dont les ARNm[565–567]. Ainsi, l'hypothèse d'une inhibition indirecte de l'export nucléaire des ARNm cellulaires par une séquestration de cette protéine XPO1 médiée par les filaments nucléaires de NSs pourrait être cohérente.

De plus, il a été décrit précédemment que les souches Mayotte 2008 et MRU25010-30 avaient 6 mutations non-silencieuses sur la séquence protéique de NSs, dont une dans ce motif : Mayotte 2008 ayant la mutation V90I. Or, dans les résultats présentés précédemment, il a également été démontré que ce mécanisme d'inhibition était très probablement souche-dépendant avec une inhibition moins franche de la réponse immunitaire par la souche Mayotte 2008. De ce fait, il se pourrait que cette mutation dans cette séquence spécifique altère la capacité de séquestration de XPO1 par le filament nucléaire de NSs de la souche Mayotte 2008, conduisant à une inhibition moins franche de l'export nucléaire des ARNm. Cependant, d'autres acteurs cellulaires sont aussi impliqués dans l'export nucléaire des ARNm, et notamment le complexe TREX. En effet, il est décrit que le complexe protéique TREX est responsable de l'export des ARNm ayant été maturés par le complexe d'épissage, alors que XPO1 va médier l'export nucléaire des ARNm reconnus par le facteur d'initiation de la

traduction eIF4E. Ce facteur est présent dans le cytoplasme et le noyau, et reconnaît certains ARNm grâce à la présence d'une structure secondaire appelée 4E-SE (eIF4E sensitivity element en anglais)[568]. Ainsi, cela justifierait également que lors de ces travaux, certains gènes n'aient pas leurs exports nucléaires significativement inhibés car utilisant probablement d'autres voies cellulaires d'exports nucléaires telle que la voie eIF4E-indépendante médiée par le complexe d'export TREX[568] (Figure 30).

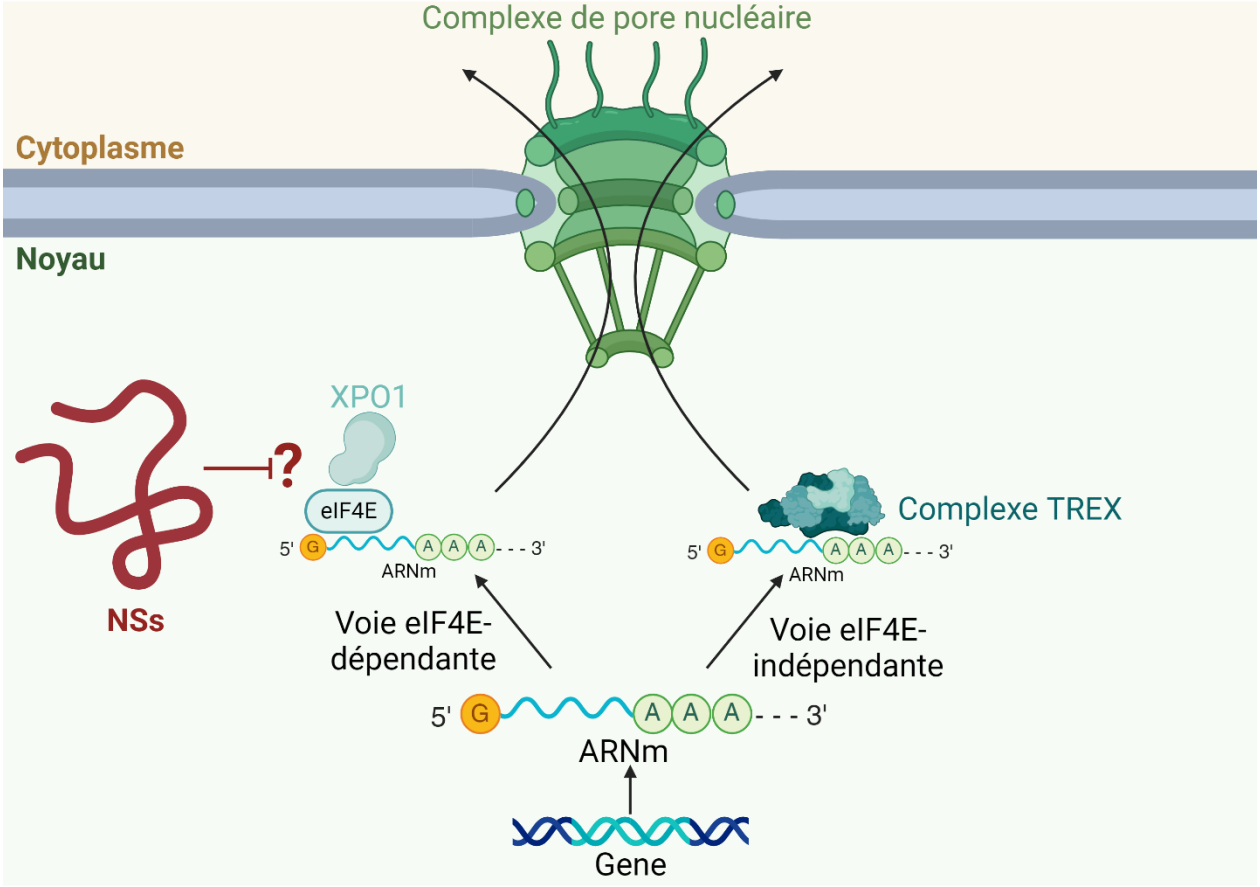


Figure 30 : Représentation schématisée de l'hypothèse du mécanisme d'inhibition des voies d'exports nucléaires des ARNm par NSs. Après transcription des ARNm cellulaires, ceux-ci vont être exportés du noyau par la voie eIF4E-indépendante médiée par les protéines du complexe TREX ou par la voie eIF4E médiée par la protéine XPO1. (eIF4E : eucaryotes Initiation Factor 4E, TREX : Transcription Export, XPO1 : Exportin 1)

XPO1 semble donc être un partenaire cellulaire de NSs intéressant et représente un candidat potentiel dans l'exploration du mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de l'export nucléaire observé. Cette stratégie virale d'inhibition semble cohérente et pourrait apporter un double avantage à la réplication du RVFV : l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm va inhiber la réponse immunitaire de façon synergique avec l'inhibition de la transcription générale, et va également favoriser la traduction des ARN viraux dans le cytoplasme en augmentant la proportion ARN viral/ARN cellulaire. Il serait donc intéressant de définir cette interaction par différentes approches : colocalisation par microscopie et immunomarquage, knock-out, co-immunoprécipitation, *etc*. Cependant, comme décrit précédemment, certains auteurs ont montré que les différentes fonctions de NSs semblent être médiées par la conformation globale des filaments plutôt que par des séquences particulières[555].

Il parait donc intéressant d'explorer cette piste afin de compléter les mécanismes moléculaires d'inhibition de la réponse immunitaire par NSs.

IV. L'origine des dommages tissulaires est-elle virale ou immunitaire ?

L'origine des dommages tissulaires conduisant aux manifestations neurologiques de la FVR est encore, à l'heure actuelle, débattue : sont-ils dus à la mise en place d'une réponse immunitaire délétère pour le SNC, à l'activité lytique directe du RVFV ou les deux ?[295,363,416]. Au cours de ces travaux, il a pu être démontré que les astrocytes représentaient un type cellulaire hautement permissif à l'infection par le RVFV conduisant à une réplication importante du RVFV en 72h. De plus, il a pu être démontré que la protéine NSs inhibait de façon-souche dépendante la mise en place précoce de la réponse immunitaire par les astrocytes, ainsi que la mise en place de l'apoptose, mécanisme également impliqué dans la lutte antivirale. En effet, en plus des différentes fonctions de NSs décrites classiquement dans l'inhibition de la réponse immunitaire, ce travail a pu mettre en évidence et conforter deux autres fonctions de NSs : l'inhibition de l'export nucléaire des ARNm cellulaires ainsi que la séquestration nucléaire des effecteurs de la voie apoptotique (caspase 3).

Tout d'abord, l'infection des astrocytes par le RVFV conduit à la mise en place retardée de l'apoptose cellulaire (activation caspase 3, expression de phosphatidylsérine), comme cela a été montré pour les cellules gliales infectées par le RVFV chez le modèle rongeur. L'induction de cette mort cellulaire confirme l'atteinte de la viabilité des astrocytes et donc de leurs différentes fonctions de soutien[366]. Ce mécanisme a également été démontré chez la souris et chez l'Homme *in vitro*, probablement du à l'induction de dommages sur l'ADN cellulaire par les filaments de NSs[353,363,456]. Or, il semblerait que cette apoptose soit également retardée par NSs à l'aide d'un mécanisme permettant la séquestration nucléaire des caspases 3 activées. D'autres études ont également décrits ce rôle de NSs chez le modèle rongeur[428,569]. De plus, l'inhibition de l'apoptose des cellules infectées est classiquement associée au facteur de virulence NSm, mais l'ensemble de ces travaux suggèrent que différents mécanismes viraux participent à l'inhibition de cette mort cellulaire programmée. Il se peut également que les cellules infectées contournent ces différentes inhibitions par la mise en place d'autres mécanismes de mort cellulaire telle que la pyroptose. La pyroptose est une mort cellulaire programmée induisant la mise en place d'une réponse inflammatoire, médiée par l'inflammasome constitué de NLRP3, et parfois décrite comme impliquée dans le déclenchement d'encéphalopathies d'origine infectieuse[166,192,367]. Dans ces travaux de thèse, il a été montré que le RVFV, et notamment la souche MRU25010-30, induisait une surexpression des ARN spécifiques de NLRP3, suggérant possiblement la mise en place de cette mort cellulaire. Très récemment, il a d'ailleurs été démontré *in vitro* sur des cellules rénales et *in vivo* chez le modèle rongeur que l'inhibition de la transcription générale par NSs conduit à l'activation d'une cascade signalétique permettant la mise en place de l'inflammasome constitué de NLRP3. Cette activation conduit à la pyroptose des cellules infectées par le RVFV et majorerait les atteintes d'origine inflammatoire chez le modèle rongeur, notamment dans le foie et la rate[570]. Le rôle de pyroptose dans la majoration de la neuroinflammation a également été démontré lors de l'infection par HEV chez le modèle rongeur[571]. Toutefois, la mortalité des astrocytes infectés par le RVFV ne semble pas conduire à une majoration de la réponse

inflammatoire, suggérant qu'ils ne mettent pas en place un mécanisme de pyroptose. Il serait donc intéressant d'explorer plus précisément le mécanisme de mort cellulaire induit par les astrocytes infectés, ainsi que par les autres cellules neurales potentiellement infectées, et ses conséquences sur la mise en place d'une neuroinflammation. De même, il serait également intéressant de déterminer si l'inhibition de l'apoptose par le RVFV favorise également les formes neurologiques, en retardant la mise en place de la réponse immunitaire et/ou en majorant la réplication du virus dans les temps précoces de l'infection.

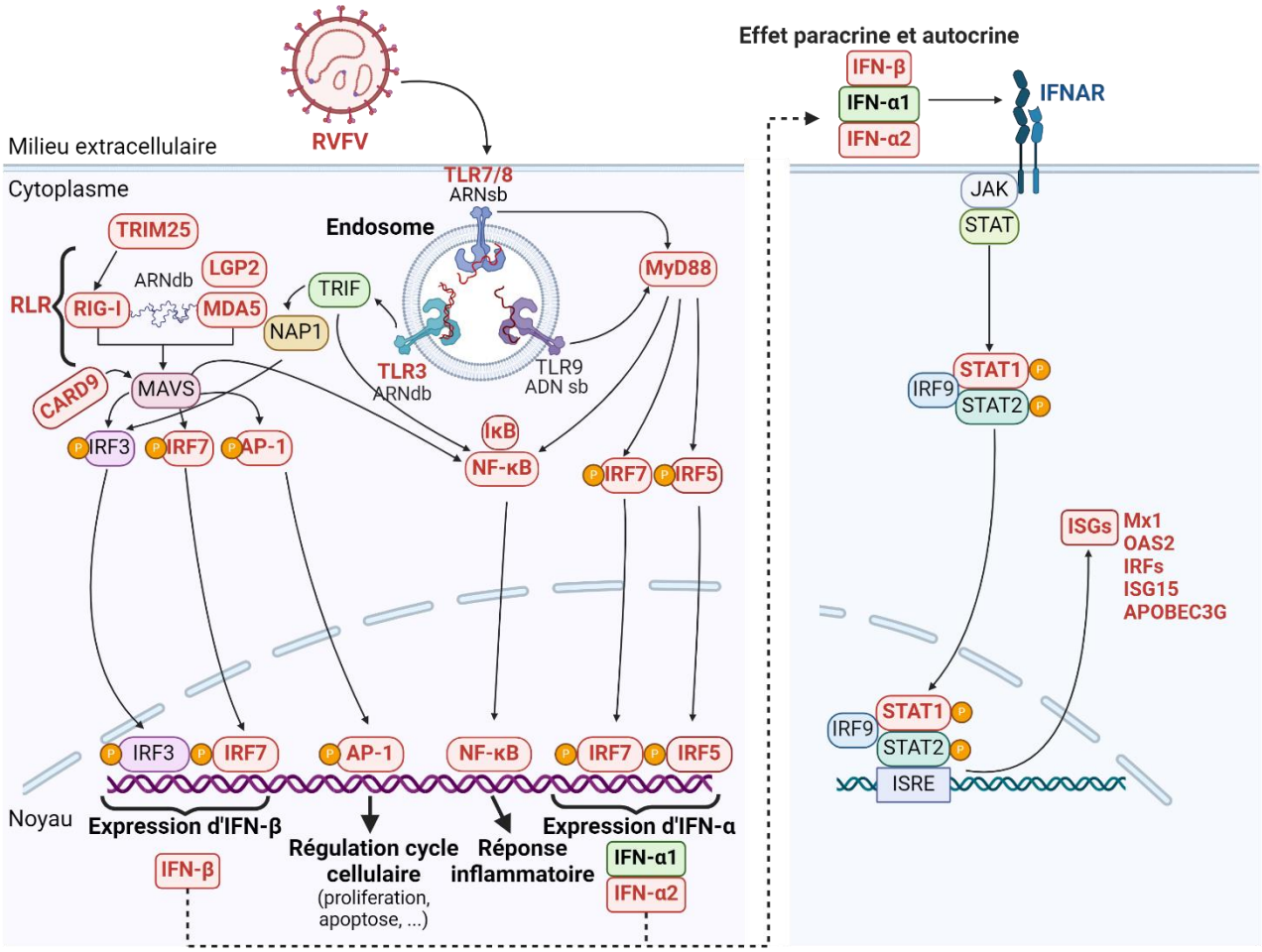


Figure 31 : Représentation simplifiée des ARN cellulaires liés à la réponse immunitaire des astrocytes et surexprimées suite à l'infection par le RVFV. Les gènes dont les ARN sont surexprimés sont représentés en rouge.

Ce travail a également montré que, malgré une surexpression des ARNm liés à de nombreuses fonctions cellulaires (réponse immunitaire, cycle cellulaire), la sécrétion des protéines associées est plus ou moins inhibée en fonction de la souche utilisée, modulant ainsi la réplication du RVFV (Figure 31). En plus du rôle de NSs dans cette inhibition, il a également été démontré dans la littérature que d'autres protéines du RVFV vont participer à cette inhibition telle que la protéine N qui, par son activité de liaison aux ARN viraux, va également se lier aux ARN de l'hôte et inhiber leur traduction dans le cytoplasme[572]. En complément de leurs différents rôles pour maintenir l'homéostasie du SNC, les astrocytes sont également fortement impliqués dans la mise en place de la réponse immunitaire dans le SNC. Il a par exemple été décrit que l'activation des microglies dépendait de cette régulation immunitaire gérée par les astrocytes lors de l'infection du SNC par le JEV[197]. De plus, lors de l'infection du

SNC par le LGTV, il a été démontré que les astrocytes jouaient un rôle majeur dans la résistance à l'infection par la mise en place de la réponse IFN[540]. Ainsi, il parait donc cohérent d'émettre l'hypothèse que cette inhibition de la réponse immunitaire par le RVFV influence fortement la neurovirulence et neuropathogénèse du RVFV. Etant donné l'importance des astrocytes dans la réponse immunitaire et dans le support des autres cellules du SNC, il semble que les dommages tissulaires observés dans les temps précoces soient d'origine virale plutôt que d'origine immunitaire. Cependant, les résultats de ce travail ne permettent pas de conclure sur la potentielle mise en place tardive par les astrocytes infectés, ou d'autres acteurs cellulaires du SNC, d'une réponse inflammatoire retardée conduisant à une neuroinflammation. Par exemple, l'infection à plus long terme pourrait induire l'astrogliose de phénotype A1, phénotype neurotoxique des astrocytes majorant la neuroinflammation à long terme. Au cours de ce travail, l'acquisition de ce phénotype par les astrocytes infectés par analyse de marqueurs spécifiques, tels que H2-D1 ou H2-T23, n'a pas été explorée, mais la surexpression des ARNm relatifs à la réponse inflammatoire (IL-6, TNFα) pourrait aller dans le sens de ce phénotype, mais cela reste à confirmer[202].

Ces résultats confirment l'observation, chez le modèle rongeur, du rôle central des cellules gliales dans la réplication du RVFV dans le SNC ainsi qu'une origine virale dans les dommages cellulaires associés à l'atteinte du parenchyme cérébral lors des formes neurologiques de RVFV. Cette conclusion va également dans le sens des études d'autres auteurs suggérant que la neuropathogénèse associée au RVFV est liée à la neuroinvasion et à l'infection par le RVFV du SNC humain[573]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les étapes précoces de l'infection induisent des dommages tissulaires d'origine virale tout en inhibant les différentes réponses cellulaires. Dans les phases précoces, il se peut que l'infection d'autres types cellulaires du SNC conduisent directement à la dégénérescence neuronale observée (infection des neurones) ou indirectement par la perte de leur fonction de soutien (cellules gliales). Il a d'ailleurs été décrit que l'infection des astrocytes et l'atteinte de leur viabilité sont des éléments majeurs de la neuropathogénèse de certains virus tel que ZIKV[471,574]. Néanmoins, d'autres explorations sont nécessaires afin de définir si les mécanismes de mort cellulaire peuvent majorer à un temps plus tardif les dommages tissulaires par la mise en place retardée d'une neuroinflammation. De même, il est difficile de juger de la mise en place de la réponse immunitaire en culture monocellulaire *in vitro*. En effet, chez le modèle murin, il a été montré que suite à l'infection du SNC par le TBEV, la mise en place de la réponse immunitaire peut différer de façon significative entre les analyses *in vitro* et *in vivo*[541]. Afin de définir plus précisément la réponse immunitaire mise en place, il semble donc important de prendre en compte la permissivité des autres cellules neurales à l'infection par le RVFV et l'ensemble des interactions cellulaires modulant la réponse immunitaire du SNC.

Neurovirulence du RVFV : perspectives à partir des données *in vitro* obtenues

I. Rôle de la neuroinflammation tardive sur les formes neurologiques

Les résultats obtenus tendent à faire penser que les dégâts tissulaires précoces sont d'origine virale et ne conduisent pas immédiatement à la mise en place d'une

neuroinflammation neurotoxique : maintien de l'intégrité de la BHE avec la mise en place d'une réponse immunitaire modérée, inhibition de la réponse immunitaire des astrocytes infectés, apoptose retardée des astrocytes infectés, *etc*. Ces résultats sont intéressants car différents des mécanismes de neuropathogénèse des flavivirus, où la mise en place d'une neuroinflammation est probablement précoce dans l'infection, comme lors de l'infection par TBEV par exemple[537,575,576]. Plusieurs arguments vont dans le sens d'une origine virale dans les atteintes cellulaires précoces et limitant la mise en place d'une neuroinflammation. Tout d'abord, lors de l'infection de la BHE ou des astrocytes par le Clone 13, la mise en place d'une réponse immunitaire non-inhibée ne semble pas conduire à de la mortalité cellulaire par un effet by-stander, comme le montre le maintien de l'intégrité de la BHE lors de l'infection par le Clone 13. Ces observations semblent indiquer qu'une réponse antivirale précoce des cellules du SNC lutte efficacement contre l'infection sans induire de dommages cellulaires indirects. De même, il a été montré au cours de ce travail que la réponse immunitaire et le recrutement de cellules immunitaires à la BHE semblaient inhibé par NSs, favorisant la neuroinvasion du RVFV et limitant la mise en place de l'inflammation du SNC. De plus, la souche Mayotte 2008, moins virulente que la souche MRU25010-30, infecte moins de cellules, se réplique moins bien et induit une réponse immunitaire plus importante. Ainsi, il semble que l'inhibition de la réponse immunitaire précoce est un élément essentiel de la neurovirulence du RVFV, comme il a pu être démontré chez le modèle rongeur[429–431].

Il se peut que, malgré l'inhibition de ces différentes réponses cellulaires, une réponse immunitaire à bas niveau ou médiée par d'autres acteurs cellulaires, et/ou l'accumulation de dommages tissulaires conduisant à la formation de DAMP, activent les cellules non-infectées par un effet by-stander. Il est d'ailleurs démontré, chez le modèle rongeur, que malgré les activités de NSs, l'infection des cellules du SNC et leur apoptose conduit à la mise en place tardive d'une réponse inflammatoire[428]. Il se peut que la mise en place de cette réponse soit retardée et/ou dérégulée et ne limite pas à temps la réplication du RVFV, comme cela est d'ailleurs montré chez le PNH où les formes fatales sont associées à un retard dans la mise en place de la réponse immuntaire[372]. De plus, il a également été montré, chez le modèle rongeur, que la cinétique de mise en place de la réponse IFN du SNC au cours d'une infection virale va moduler les cellules impliquées et les mécanismes immunitaires mis en place[540]. Etant donné que la réponse immunitaire retardée est probablement inefficace contre l'infection par le RVFV, il est possible que cette inflammation perdure dans le temps et majore progressivement la neuroinflammation se manifestant par les observations histologiques tardives décrites précédemment : ouverture de la BHE, méningo-encéphalite, recrutement massif de leucocytes dans le SNC associé à une activation endothéliale, pleiocytose, dégénérescence neuronale, *etc*[193,342,353,356,357,461,466,504]. Dans le sens de cette hypothèse, certaines études ont décrit que des patients manifestant une forme neurologique de RVFV ne présentaient pas de signe de neuroinflammation dans les premiers temps d'hospitalisation, suggérant alors une atteinte virale dans les temps précoces de l'infection, mais que la neuroinflammation se majore avec le temps tout en étant associée à une augmentation de la sévérité des symptômes neurologiques[466]. De même, il est souvent décrit chez le modèle murin que les formes neurologiques sont associées à une importante transmigration leucocytaire vers le SNC, mais cette observation est variable chez le singe et l'Homme où cette infiltration n'est pas toujours décrite, ce qui suggère

l'apparition des premiers symptômes neurologiques indépendamment d'une neuroinflammation[355,461,466]. Les résultats de ce travail ainsi que la littérature sur les formes neurologiques humaines tendent à faire penser que la neuroinflammation pourrait bel et bien jouer un rôle sur la neuropathogénèse du RVFV, mais à des stades tardifs de l'infection en majorant les dommages tissulaires. Ce mécanisme de pathogénèse induisant des dommages cellulaires d'origine virale dans les temps précoces puis potentiellement majoré par la mise en place d'une inflammation retardée est d'ailleurs décrit dans d'autres organes, tel que le foie des souris ou chez les ruminants[359,363]. Cette cinétique de neuropathogénèse a déjà été décrite lors de l'infection du SNC par le TBEV, et notamment sur le rôle secondaire de la réponse immunitaire dans les dommages tissulaires[536].

L'ensemble de ces conclusions et hypothèses montrent l'importance de la communication intercellulaire et la temporalité dans mise en place de la réponse immunitaire. Il est ainsi possible d'émettre une hypothèse sur le retardement des formes neurologiques chez l'Homme. Tout d'abord, il faut que le RVFV se dissémine jusqu'au compartiment sanguin afin de pouvoir atteindre le SNC en passant au travers de la BHE tout en inhibant la réponse immunitaire mise en place par celle-ci, ceci sans effet délétère sur son intégrité. Le RVFV va ensuite pouvoir infecter *a minima* les astrocytes et se répliquer. Au cours de cette réplication, la capacité du RVFV à inhiber la réponse immunitaire du SNC va définir le niveau de virulence : une réponse immunitaire précoce apportant probablement une résistance à l'infection alors qu'une réponse immunitaire retardée ne sera pas efficace dans la lutte antivirale contre le RVFV. Après suffisamment de dommages tissulaires associés à la réplication et à la charge virale du RVFV, des premiers symptômes neurologiques vont se manifester. Si ces dommages tissulaires conduisent à une neuroinflammation retardée, il est probable que celle-ci majore les atteintes neurologiques et conduisent à des formes neurologiques dont la sévérité est plus intense. Le retardement des formes neurologiques associées à l'infection du RVFV serait donc lié à la colonisation tardive du SNC ainsi qu'à l'enchainement de ces différentes étapes. Cependant, les hypothèses associées à ces étapes tardives ne sont que spéculatives et nécessitent de plus amples explorations, et notamment dans un contexte cellulaire permettant de définir réellement les acteurs précis et la cinétique de la mise en place de la réponse immunitaire contre l'infection du SNC par le RVFV.

II. Conclusions *in vitro* et confirmations *in vivo*

Que ce soit pour la définition du neurotropisme, de la neuroinvasion, ou de toute autre exploration de ce travail concernant les mécanismes de neurovirulence associés à l'infection humaine par le RVFV, le rôle des interactions intercellulaires semble primordial. La complexité du SNC illustre parfaitement le rôle crucial de ces interactions dans le fonctionnement de ce système biologique et dans la régulation de ses fonctions cellulaires. Ainsi, il semble important de valider les conclusions et hypothèses de ce travail par des modèles cellulaires plus complexes intégrant ces interactions. Certains auteurs ont d'ailleurs mis en avant l'importance de se rapprocher des conditions *in vivo* afin d'obtenir des conclusions adaptées à un contexte biologique réel dans l'étude de la neurovirulence[541]. Les modèles animaux ont pour but d'étudier les mécanismes de pathogénèse virale dans ce contexte biologique réel, mais ils ont également leurs limites[577,578]. En effet, malgré que les manifestations neurologiques induites

dans certains modèles animaux soient très proches de celles décrites chez l'Homme, les résultats de ce travail de thèse ont mis en avant une différence de résistance de la BHE humaine comparée à celle du modèle rongeur. De même, il est décrit chez le modèle PNH que le LCR ne contient pas de virions suite à l'infection par le RVFV alors que plusieurs études ont confirmé la présence de virions dans le LCR humain, suggérant ainsi une permissivité différente de la BSLCR humaine et simienne. De ce fait, il se pourrait qu'un facteur espèce de l'hôte puisse également influencer les mécanismes de neuropathogénèse du RVFV, comme il est également décrit pour la sévérité et la diversité des symptômes associés à l'infection par le RVFV. Ainsi, un facteur espèce peut potentiellement représenter un biais non négligeable dans l'étude de la neurovirulence du RVFV.

Il paraît donc important d'explorer les mécanismes de neurovirulence du RVFV chez l'Homme à l'aide de modèles composés uniquement de cellules humaines. Pour ce faire, l'étude de la neuroinvasion à travers la NVU, une organisation cellulaire plus complexe, doit être étudiée à l'aide de modèles *in vitro* composés de différents types cellulaires, allant de la culture cellulaire sur filtre comme décrite dans ce travail jusqu'à la création de puces micro-fluidiques mimant artificiellement les différents compartiments de la NVU[61,499,579]. L'avantage de ces modèles *in vitro* multicellulaires est leur capacité de modulation : ils permettent d'explorer précisément les mécanismes de virulence dans des conditions contrôlées et variées afin de tester les influences précises de chaque acteur de cette communication intercellulaire. L'utilisation de modèles *in vitro* permet donc d'établir des pistes précises mais préliminaires sur les différents mécanismes de virulence. Ces pistes permettent ensuite de définir et d'orienter les recherches sur des modèles plus complexes où les interactions précises sont plus difficiles à analyser. La complémentarité de ces approches est d'ailleurs recommandée par certains auteurs afin d'explorer la neuroinvasion virale dans toutes ses dimensions et à toutes ses échelles[174].

Il parait plus aisé d'utiliser des échantillons d'origine humaine issus de biopsies pour analyser les effets de l'infection du RVFV sur le SNC humain. Il est cependant difficile d'étudier l'infection naturelle chez l'Homme lors des infections virales du SNC : irrégularité des épidémies, analyse histologique du SNC possible seulement dans le cas du décès d'un patient infecté, prévalence des formes neurologiques très variable, paramètres d'infection non-connus ni maitrisés, accessibilité des échantillons, collaboration internationale à mettre en place[144]… De nouveaux modèles issus d'échantillons humains, tels que les tranches organotypiques, pourraient permettre d'étudier ces mécanismes de neurovirulence à l'échelle biologique du SNC humain[580,581]. Ces modèles ont par exemple permis d'explorer les mécanismes de neurovirulence associés à la présence de cellules immunitaires infectées par le HIV dans le SNC[582]. Néanmoins, l'accessibilité réduite à ces modèles issus de biopsies humaines rend les expérimentations difficiles à mettre en place[583]. L'alternative la plus intéressante à l'heure actuelle est l'utilisation d'organoïdes, soit issus de la différenciation *in vitro* de cellules souches pluripotentes, soit issus de biopsies cérébrales[580,584,585]. Capable d'être maintenus en culture, ces organoïdes possèdent une organisation multicellulaire représentant la structure biologique du SNC humain avec plusieurs méthodes déjà développées afin d'étudier la neurovirulence[584,586,587]. L'utilisation de ces organoïdes humains faciliterait la mise en place de plans expérimentaux permettant l'étude de la neurovirulence du RVFV chez l'Homme dans un contexte cellulaire biologique et permettrait de confirmer ou d'infirmer les conclusions de

ce travail de thèse[588]. Certains modèles d'organoïdes plus complexes, appelés assembloïdes, sont complétés par l'intégration d'un système vasculaire et permettent également d'étudier des mécanismes très précis tels que les mécanismes de neuroinvasion[61,585,587].

III. Impact de la voie de transmission sur la neurovirulence du RVFV : aérosols versus vecteurs

Il est décrit que la voie de transmission majoritaire du RVFV de l'animal vers l'Homme est la transmission par aérosols. Cette voie de transmission a longtemps été considérée comme principalement responsable des formes neurologiques par certains auteurs, faisant de celle-ci une arme de bioterrorisme potentielle[95,131,461,589]. Suite à ces travaux de thèse et à la description *in vitro* d'un mécanisme de neuroinvasion par la voie hématogène, il est désormais probable que l'augmentation de la virémie du RVFV puisse conduire à l'infection du SNC. Il semble donc maintenant raisonnable de penser que la transmission par piqure de moustique (infection périphérique) puisse être à l'origine de manifestations neurologiques chez l'Homme, comme c'est le cas chez le modèle rongeur. Le même constat pourrait d'ailleurs être transposé sur la transmission par voie orale lors de l'ingestion d'aliments contaminés, mais les mécanismes d'infection suivant cette voie de transmission restent très peu décrits dans le cas du RVFV. De plus, il est décrit chez le modèle rongeur, ainsi que chez le modèle PNH, le furet ou encore certains ruminants, que la transmission par aérosols majore la rapidité et la sévérité des formes neurologiques, probablement par un autre mécanisme de neuroinvasion[355,358,418,419,421]. Il parait donc cohérent de se demander si la voie de transmission du RVFV vers l'Homme peut également influencer l'apparition et la sévérité des formes neurologiques[95]. La majorité des patients hospitalisés déclarent avoir été en contact avec des animaux infectés, suggérant alors une infection par aérosols. Cette proportion est variable en fonction des épidémies, mais une proportion plus ou moins importante de patients (jusqu'à 25%) a déclaré des formes sévères de RVFV incluant des formes neurologiques sans pour autant avoir été en contact avec ou à proximité d'animaux infectés, suggérant alors une infection possible par piqures de moustiques ou ingestion d'aliments contaminés[252,338,339,463,469,590]. Toutefois, la causalité directe de la voie de transmission sur la sévérité des symptômes ainsi que leurs manifestations n'a jamais été explorée, notamment dû à la difficulté de l'obtention de jeux de données robustes. De plus, un élément encore peu maitrisé de la physiopathologie du RVFV est le déclenchement de forme neurologique retardée aiguë associée à une mortalité importante, ou subaiguë dont les manifestations sont moins intenses mais pouvant conduire à des séquelles neurologiques définitives[214,416]. Si la voie de transmission est associée à la rapidité et la sévérité des symptômes neurologiques, il est alors possible que la voie de transmission soit également corrélée aux manifestations de formes aiguës ou subaiguës. Dans ce sens, il a été suggéré par d'autres auteurs suite à la comparaison de la virulence entre WNV, JEV et TBEV chez la souris que le mécanisme de neuroinvasion puisse corréler avec la pathogénèse du virus[591].

Il a été démontré chez le modèle rongeur que l'infection de l'épithélium olfactif par aérosols conduit à des manifestations neurologiques plus rapides et sévères, très probablement par un mécanisme de transport axonal rétrograde à partir des nerfs olfactifs mais qui restent à confirmer[358,427]. Cet aspect, encore inconnu chez l'Homme, nécessite des approches *in vitro*, comme celles présentées dans ce travail, afin d'établir la permissivité de cet épithélium à

l'infection par le RVFV, ainsi que l'existence de ce mécanisme de transport axonal par les neurones humains infectés. Si ces différentes capacités sont confirmées, il serait alors possible que le RVFV accède au SNC humain suite à l'infection des neurones olfactifs, ou oculaires lors de l'infection de la rétine, par ce mécanisme de neuroinvasion non-hématogène. Ces hypothèses restent à l'heure actuelle spéculatives et nécessitent de nombreuses explorations expérimentales pour définir l'existence ou non de ces mécanismes, et de leurs impacts sur la neurovirulence du RVFV chez l'Homme. Il a également été démontré que l'hôte dans lequel se réplique le RVFV peut influencer la virulence de la souche de RVFV, notamment par modulation des motifs de glycosylation présents sur l'enveloppe virale, et il se pourrait alors que les souches de RVFV ayant été amplifiées dans le vecteur moustique soient davantage neurovirulentes[325,418,426]. De plus, certains auteurs ont observé que la co-incubation du RVFV avec de la salive de moustiques majorait sa virulence et ont fait l'hypothèse que la salive de moustiques pourrait favoriser l'ouverture de la BHE et donc la neuroinvasion du RVFV[592]. Comme proposé précédemment, le niveau de virémie du RVFV pourrait également influencer ses capacités de neuroinvasion par la voie hématogène. Si c'est le cas, il se pourrait alors qu'une souche dont la virulence est accrue via la transmission par piqure de moustiques favorise les formes neurologiques. En revanche, la transmission par ingestion d'aliments contaminés représenterait la voie favorisant le moins la neuroinvasion : pas d'amplification chez le vecteur, pas d'accès aux nerfs olfactifs et/ou oculaires. Cependant, il se pourrait également qu'un facteur hôte tel que le polymorphisme immunitaire ou encore le réservoir mammifère ayant permis l'amplification du virus influence également la neurovirulence du RVFV.

Etant donné que ces voies de transmission pourraient potentiellement moduler les manifestations neurologiques chez l'Homme, il semble crucial de déterminer expérimentalement leurs influences. En se basant sur la littérature, sur les mécanismes de neurovirulence décrits dans ce travail ainsi que chez les modèles animaux, il paraît cohérent de penser que les formes aiguës pourraient être favorisées par une colonisation rapide du SNC, donc potentiellement suite à l'infection par aérosols. A l'inverse, l'infection par piqures de moustiques ou ingestion d'aliments infectés nécessite une dissémination complète du RVFV par la voie hématogène et accède donc plus tardivement au SNC. Le fait que la réponse immunitaire périphérique, même retardée, est mise en place précocement avant la colonisation du SNC pourrait justifier que cette infection conduise à une forme subaiguë qui finira par être contrôlée par le système immunitaire. En effet, il a été montré que l'immunisation de souris, en amont d'une infection par aérosols, les protège des formes neurologiques, suggérant donc un rôle de la réponse immunitaire périphérique dans la résistance face aux formes neurologiques[593]. Il est également possible que l'existence de formes aiguës ou subaiguës soit uniquement influencée par un facteur immunitaire de l'hôte avec un spectre d'efficacité de réponse modulant la résistance à l'infection et la sévérité des manifestations[377]. Ces hypothèses restent spéculatives et méritent d'être confirmées par des enquêtes épidémiologiques et des explorations expérimentales. Déterminer si l'une de ces voies est réellement associée à une majoration des formes neurologiques permettrait de mieux préciser les mesures préventives des formes neurologiques et leurs prises en charge médicales : équipement de protection individuelle des personnels exposés aux aérosols (lunettes et/ou masque), protection face aux

piqures de moustiques, anticipation de la sévérité des symptômes en fonction de la voie de transmission, *etc*.

IV. Anticipation des formes neurologiques sur le terrain à partir des facteurs d'origine virale modulant la neurovirulence de la souche de RVFV

Pour finir, à l'aide de ce travail, certains facteurs viraux ont été suspectés comme pouvant moduler la neurovirulence du RVFV. En effet, certaines mutations concernant la glycoprotéine de surface Gn du RVFV pourraient influencer ses capacités de neuroinvasion. De même, il a pu être montré au cours de ce travail que certaines mutations concernant le facteur de virulence NSs pourraient justifier des niveaux d'inhibition différents de la réponse immunitaire par les souches de RVFV et modulant ainsi leur neurovirulence[362]. Ainsi, des mutations non-silencieuses sur ces deux facteurs du RVFV pourraient potentiellement justifier la différence de virulence entre les souches MRU25010-30 et Mayotte 2008. En effet, il a par exemple été décrit chez TBEV ou CHIKV que quelques mutations sur les protéines virales telles que la protéine d'enveloppe E, la polymérase NS5 ou le facteur de virulence NS1 impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire peuvent moduler la neurovirulence de ces virus neurotropes, validant alors cette approche pour explorer la variabilité de la neurovirulence du RVFV[507,537]. De plus, les résultats *in vitro* obtenus au cours de ce travail, ainsi que dans la littérature, imagent parfaitement la neurovirulence réelle des souches utilisées : l'épidémie à partir de laquelle la souche MRU25010-30 a été isolée était associée à un taux de mortalité humaine et cameline plus important accompagnée de manifestations neurologiques (13 morts sur 63 cas humains, soit 20,6%), alors qu'au cours de l'épidémie à partir de laquelle a été isolée la Mayotte 2008, aucune forme neurologique et aucun décès n'ont été déclarés. Cependant, les caractéristiques précises des formes neurologiques et de la mortalité associées ne sont pas ou peu décrites pour ces deux épidémies[337,594]. Or, ce travail de thèse, ainsi que d'autres travaux dans la littérature, ont mis en avant que la souche MRU25010-30 a des caractéristiques *in vitro* de neurovirulence importante et supérieurs à ceux de Mayotte 2008 (neuroinvasion, réplication sur cellules gliales, inhibition de la réponse immunitaire)[508]. Ainsi, les résultats obtenus correspondent parfaitement à ces données épidémiologiques et valident dans une certaine mesure les conclusions de ce travail. De plus, ces données épidémiologiques et les conclusions de ce travail confirment le rôle crucial la réponse immunitaire précoce dans la résistance à l'infection par le RVFV et le déclenchement de formes neurologiques.

Pour finir, il a été démontré que la prévalence des formes neurologiques est très variable en fonction des épidémies[462]. Or, le facteur géographique influence la phylogénie du RVFV, et les différentes épidémies sont associées à différentes souches de RVFV[247,595]. Dans ce sens, l'analyse de données épidémiologiques a démontré que la virulence du RVFV était bien corrélée à un facteur souche, malgré des différences très faibles sur leurs séquences protéiques et nucléotidiques, confirmant le rôle potentiel de quelques mutations non-silencieuses sur la virulence de la souche plutôt que des mécanismes de réassortiments[248,596]. Ainsi, il semble cohérent de penser qu'un facteur souche puisse influencer la neurovirulence du RVFV et la manifestation de symptômes neurologiques. Dans un intérêt sanitaire, il est intéressant d'explorer le rôle des différentes mutations de Gn et NSs présentées dans ce travail sur la neurovirulence des souches. Cette exploration pourrait être faîte par ingénierie moléculaire et

par l'infection des modèles *in vitro* présentés dans ce travail ou par l'infection de modèles murins où la neuropathogénèse est mieux caractérisée. De même, il serait également intéressant de mettre en place une étude épidémiologique *a postériori* sur les manifestations neurologiques associées à chaque épidémie de RVFV (sévérité, prévalence), corrélées aux séquences protéiques des différentes souches ainsi que la voie d'inoculation potentielle des patients. Malgré que ces jeux de données soient très probablement incomplets, il permettrait peut-être de déterminer de nouvelles pistes prédictives afin de déterminer la neurovirulence des souches de RVFV. En effet, définir des facteurs viraux modulant la neurovirulence du RVFV permettrait aux autorités de santé publique d'établir des outils prédictifs permettant d'anticiper et protéger les populations face aux formes neurologiques sévères du RVFV. Certains auteurs ont d'ailleurs crée un outil afin de définir l'origine des nouvelles souches séquencées, tout en suggérant que cette approche serait intéressante dans les stratégies prédictives et préventives de santé publique[595]. En effet, la détermination rapide de la séquence protéique d'une souche de RVFV impliquée dans une nouvelle épizootie, détermination facilitée par le développement des nouvelles technologies de séquençage et la diminution de leurs couts, permettrait d'anticiper le risque neurologique associé. Anticiper ce risque à chaque nouvelle épizootie permettrait de préparer les organismes de santé publique à la prise en charge de l'épidémie potentiel qui en résulterait[507].

Conclusion générale

Ce travail de thèse a, pour la première fois, exploré la neurovirulence humaine du RVFV et a permis de confirmer et de développer certains de ses aspects étudiés grâce à des modèles animaux. A l'aide de ce travail, il a pu être défini que le RVFV est capable d'accéder *in vitro* au SNC par un mécanisme NSs-indépendant de neuroinvasion, par infection directe des cellules endothéliales de la BHE. Suite à la neuroinvasion dont la rapidité et l'efficacité semblent être soumises à un facteur souche (inhibition réponse immunitaire, protéine de surface) ou possiblement à la voie d'inoculation, le RVFV est capable d'infecter un type cellulaire majeur du SNC, les astrocytes. Cette infection permet une importante réplication du RVFV, une caractéristique directement corrélée à la pathogénèse du RVFV, et conduit à une atteinte de la viabilité cellulaire par la mise en place d'une apoptose retardée des cellules infectées. Etant donné les nombreux rôles de ces cellules gliales, il est possible que leur infection altère leurs fonctions de soutien, ce qui pourrait alors expliquer le développement de symptômes neurologiques. Cette infection est également associée à l'inhibition, par le facteur de virulence NSs, de la mise en place de la réponse immunitaire des cellules infectées qui limiterait la réplication du RVFV. Ainsi, au stade précoce de l'infection, il semble que les dommages tissulaires soient d'origine virale dans le SNC. Cependant, cette inhibition et les dommages cellulaires pourraient conduire à la mise en place retardée de la réponse immunitaire, conduisant alors à une neuroinflammation tardive majorant les dommages tissulaires d'origine virale (Figure 32). Il est possible que certains facteurs d'origine virale, et notamment l'inhibition de la réponse immunitaire par NSs, puisse influencer cette neuropathogénèse, et sont à l'origine de pistes intéressantes de stratégies prédictives dans la lutte contre la FVR en santé publique.

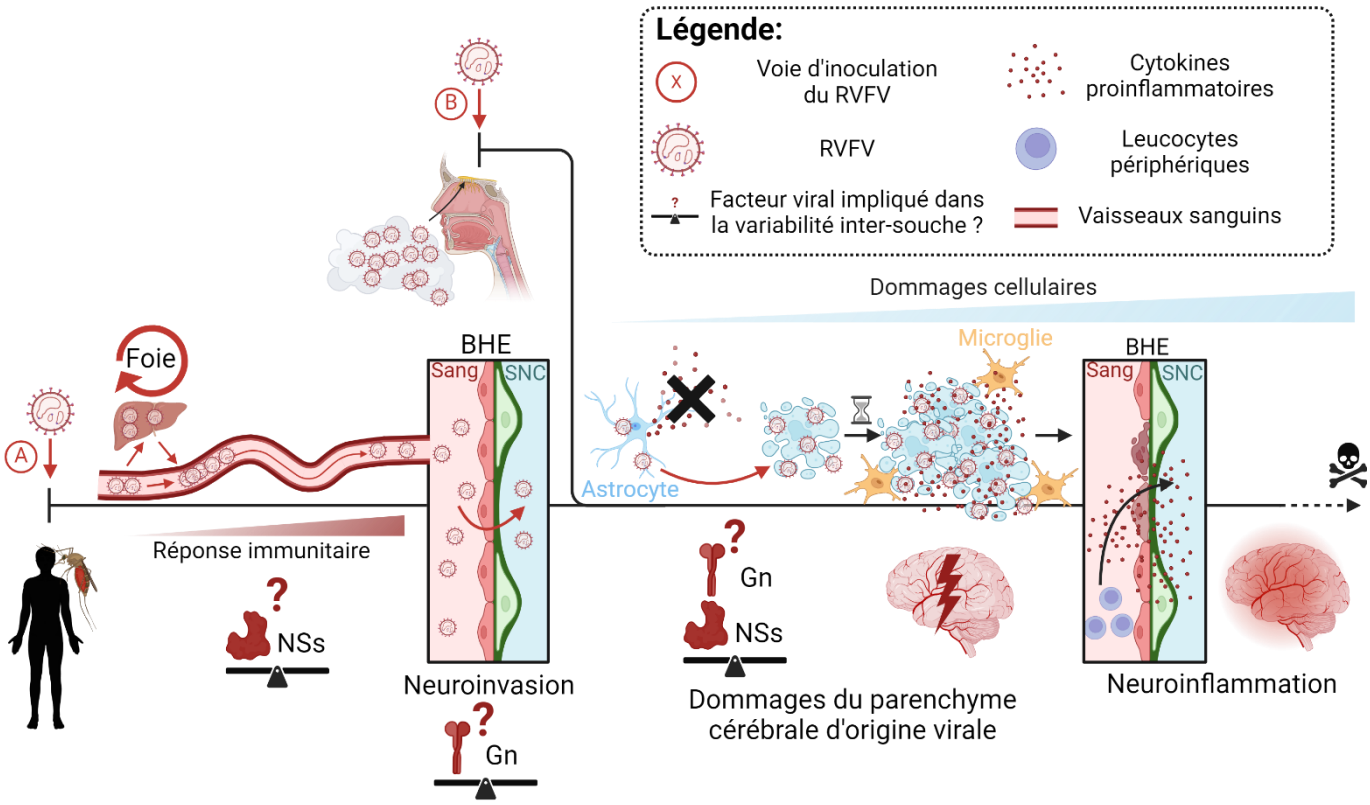


Figure 32 : Représentation schématique reprenant les hypothèses liées à la neurovirulence humaine du RVFV, pouvant influencer la cinétique d'infection du système nerveux central par le RVFV et les manifestations neurologiques qui en découlent : soit suite à l'infection par piqures de moustiques pouvant conduire à une forme neurologique subaiguë (A), soit suite à une infection par aérosols pouvant conduire à une forme aiguë (B) (RVFV : Rift Valley fever virus, BHE : Barrière Hémato-Encéphalique, Gn : glycoprotéine, NSs : protéine Non Structurale S)

Certaines discordances entre les résultats obtenus au cours de cette thèse et ceux issus de modèles animaux ont confirmé l'intérêt d'utiliser des approches *in vitro* à partir de des cellules humaines. Comprendre les mécanismes de pathogenèse à de petites échelles permet d'explorer des interactions précises qui peuvent parfois être dissimulées dans des modèles plus complexes. Cependant, ces approches *in vitro* ont également leurs limites et les conclusions de ce travail nécessitent une confirmation en utilisant des modèles plus complexes, idéalement des modèles représentant la complexité biologique des communications intercellulaires du SNC. Ce travail de thèse illustre que la recherche fondamentale sur les mécanismes de pathogénèse d'un virus permet de comprendre et de confirmer certains mécanismes d'infection, mécanismes qui sont parfois complexes à explorer en conditions biologiques réelles, notamment chez l'Homme. De plus, même si elles restent incertaines, ces conclusions permettent d'établir des pistes sérieuses orientant les futures recherches sur la neurovirulence du RVFV, ainsi que des pistes permettant d'anticiper potentiellement la neurovirulence du RVFV en fonction caractéristiques virales ou de l'hôte. Cela permettrait d'établir rapidement les mesures de prévention et de prise en charge adaptées à la souche circulante pendant une épidémie. Pour finir, ces approches permettent de mettre en lumière certains manques de connaissances liées à des fonctions biologiques globales, tel que le mécanisme d'élimination des cellules de la BHE, et permet donc d'ouvrir, de façon multidisciplinaire, des pistes de recherches en biologie fondamentale.

Références bibliographiques

1. Flint, J., Racaniello, V., Rall, G., Hatziioannou, T. & Skalka, A. M. *Principles of Virology, Multi-Volume, 5th Edition*. (ASM, 2021).
2. Baker, R. E. *et al.* Infectious disease in an era of global change. *Nat. Rev. Microbiol.* **20**, 193–205 (2022).
3. Carlson, C. J. *et al.* Climate change increases cross-species viral transmission risk. *Nature* **607**, 555–562 (2022).
4. Charlier, J. *et al.* Disease control tools to secure animal and public health in a densely populated world. *Lancet Planet. Heal.* **6**, e812–e824 (2022).
5. Muñoz, L. S., Garcia, M. A., Gordon-Lipkin, E., Parra, B. & Pardo, C. A. Emerging Viral Infections and Their Impact on the Global Burden of Neurological Disease. *Semin. Neurol.* **38**, 163–175 (2018).
6. Bazira, P. J. An overview of the nervous system. *Surg.* **39**, 451–462 (2021).
7. Purves, D. *et al. Neuroscience*. (Sunderland, Mass. : Sinauer, 2008).
8. Ludwig, P. E., Reddy, V. & Varacallo, M. *Neuroanatomy, Central Nervous System (CNS). StatPearls* (2024).
9. Shirzadfar, H. The Structure and Function of Nervous System and Skeletal Muscle: A Review. *Curr. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. Reports* **3**, 1–25 (2021).
10. Wehrwein, E. A., Orer, H. S. & Barman, S. M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr. Physiol.* **6**, 1239–1278 (2016).
11. De Looff, P. C., Cornet, L. J. M. M., Embregts, P. J. C. M. C. M., Nijman, H. L. I. I. & Didden, H. C. M. M. Associations of sympathetic and parasympathetic activity in job stress and burnout: A systematic review. *PLoS One* **13**, 1–24 (2018).
12. Fried, I. Neurons as will and representation. *Nat. Rev. Neurosci.* **23**, 104–114 (2022).
13. O'Leary, F. & Campbell, M. The blood–retina barrier in health and disease. *FEBS J.* **290**, 878–891 (2023).
14. Reinhold, A. K. & Rittner, H. L. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. *Pflugers Arch.* **469**, 123–134 (2017).
15. Kole, A. J., Annis, R. P. & Deshmukh, M. Mature neurons: equipped for survival. *Cell Death Dis.* **4**, 1–8 (2013).
16. Boldrini, M. *et al.* Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* **22**, 589-599.e5 (2018).
17. Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G. & Macklis, J. D. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog. Neurobiol.* **75**, 321–341 (2005).
18. Cooke, S. F. & Bliss, T. V. P. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* **129**, 1659–1673 (2006).

19. Sandner, B. *et al.* Neural stem cells for spinal cord repair. *Cell Tissue Res.* **349**, 349–362 (2012).

20. van Riel, D., Verdijk, R. & Kuiken, T. The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J. Pathol.* **235**, 277–287 (2015).

21. Sakka, L., Coll, G. & Chazal, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **128**, 309–316 (2011).

22. Darmanis, S. *et al.* A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7285–7290 (2015).

23. Lawrence, J. M., Schardien, K., Wigdahl, B. & Nonnemacher, M. R. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol. Commun.* **11**, 1–28 (2023).

24. Borsani, E., Della Vedova, A. M., Rezzani, R., Rodella, L. F. & Cristini, C. Correlation between human nervous system development and acquisition of fetal skills: An overview. *Brain Dev.* **41**, 225–233 (2019).

25. Rao, M. S. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat. Rec.* **257**, 137–148 (1999).

26. Bacigaluppi, M., Sferruzza, G., Butti, E., Ottoboni, L. & Martino, G. Endogenous neural precursor cells in health and disease. *Brain Res.* **1730**, 146619 (2020).

27. Gonçalves, J. T., Schafer, S. T. & Gage, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* **167**, 897–914 (2016).

28. Bonaguidi, M. A. *et al.* Mammalian Brain. (2024).

29. Mohammad, M. G. *et al.* Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J. Clin. Invest.* **124**, 1228–1241 (2014).

30. Michalski, J. P. & Kothary, R. Oligodendrocytes in a nutshell. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–11 (2015).

31. Bradl, M. & Lassmann, H. Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 37–53 (2010).

32. McTigue, D. M. & Tripathi, R. B. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J. Neurochem.* **107**, 1–19 (2008).

33. Du, Y. & Dreyfus, C. F. Oligodendrocytes as providers of growth factors. *J. Neurosci. Res.* **68**, 647–654 (2002).

34. Simons, M. & Nave, K. A. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).

35. Helmut, K., Hanisch, U. K., Noda, M. & Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* **91**, 461–553 (2011).

36. Nayak, D., Roth, T. L. & McGavern, D. B. Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 367–402 (2014).

37. Jensen, C. J., Massie, A. & De Keyser, J. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **8**, 824–839 (2013).

38. Van Rossum, D. & Hanisch, U. K. Microglia. *Metab. Brain Dis.* **19**, 393–411 (2004).

39. Mayer, M. G. & Fischer, T. Microglia at the blood brain barrier in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* **18**, 1–19 (2024).

40. Tremblay, M. È. *et al.* The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* **31**, 16064–16069 (2011).

41. Bossuyt, J. *et al.* Chemogenetic modulation of astrocytes and microglia: State-of-the-art and implications in neuroscience. *Glia* **71**, 2071–2095 (2023).

42. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7–35 (2010).

43. Kofuji, P. & Araque, A. Astrocytes and Behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* **44**, 49–67 (2021).

44. Carpentier, P. A. *et al.* Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* **49**, 360–374 (2005).

45. Isik, S., Yeman Kiyak, B., Akbayir, R., Seyhali, R. & Arpaci, T. Microglia Mediated Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Cells* **12**, (2023).

46. De Keyser, J., Mostert, J. P. & Koch, M. W. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J. Neurol. Sci.* **267**, 3–16 (2008).

47. Kwon, D. Guardians of the Brain. *Sci. Am.* **33**, None (2022).

48. Engelhardt, B. Cluster: barriers of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **135**, 307–310 (2018).

49. Nag, S., Haqqani, A. S., Hill, J. J., Mullen, J. & Stanimirovic, D. B. The Blood-Brain and Other Neural Barriers. in *Methods in Molecular Biology* vol. 686 337–353 (2011).

50. Richner, M. *et al.* Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy. *Front. Neurosci.* **13**, 1–9 (2019).

51. Cunha-Vaz, J. G. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp. Eye Res.* **78**, 715–721 (2004).

52. Ueno, M. *et al.* Blood–brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier in normal and pathological conditions. *Brain Tumor Pathol.* **33**, 89–96 (2016).

53. Croese, T., Castellani, G. & Schwartz, M. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. *Nat. Immunol.* **22**, 1083–1092 (2021).

54. Kadry, H., Noorani, B. & Cucullo, L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS* **17**, 1–24 (2020).

55. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).

56. Solár, P., Zamani, A., Kubíčková, L., Dubový, P. & Joukal, M. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids Barriers CNS* **17**, 1–29 (2020).

57. Cui, J., Xu, H. & Lehtinen, M. K. Macrophages on the margin: choroid plexus immune responses. *Trends Neurosci.* **44**, 864–875 (2021).

58. Marques, F. *et al.* The choroid plexus in health and in disease: dialogues into and out of

the brain. *Neurobiol. Dis.* **107**, 32–40 (2017).

59. McConnell, H. L. & Mishra, A. Cells of the Blood–Brain Barrier: An Overview of the Neurovascular Unit in Health and Disease. *Methods Mol. Biol.* **2492**, 3–24 (2022).

60. Segarra, M., Aburto, M. R. & Acker-Palmer, A. Blood–Brain Barrier Dynamics to Maintain Brain Homeostasis. *Trends Neurosci.* **44**, 393–405 (2021).

61. Hajal, C., Le Roi, B., Kamm, R. D. & Maoz, B. M. Biology and Models of the Blood-Brain Barrier. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **23**, 359–384 (2021).

62. Zhao, Y. *et al.* Factors influencing the blood-brain barrier permeability. *Brain Res.* **1788**, 147937 (2022).

63. Keaney, J. & Campbell, M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* **282**, 4067–4079 (2015).

64. Lewandowsky, M. Zur lehre der cerebrospinalflussigkeit. *Z. klin. Med.* **40**, 480–494 (1909).

65. Goldmann, E. Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute. *Abh. Preuss. Akad. Wiss. Phys. -Math.* **1**, 1–60 (1913).

66. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).

67. Nzou, G. Fundamental Neurovascular Components for the Development of Complex and Dynamic in Vitro Brain Equivalent Models. *Alzheimer's Neurodegener. Dis.* **5**, 1–14 (2019).

68. Worzfeld, T. & Schwaninger, M. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 340–362 (2016).

69. Bauer, H.-C., Krizbai, I. A., Bauer, H. & Traweger, A. 'You Shall Not Pass' - tight junctions of the blood brain barrier. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).

70. Brown, R. C., Morris, A. P. & O'Neil, R. G. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* **1130**, 17–30 (2007).

71. Günzel, D. & Yu, A. S. L. *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. *Physiological Reviews* vol. 93 (2013).

72. Lochhead, J. J., Yang, J., Ronaldson, P. T. & Davis, T. P. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front. Physiol.* **11**, (2020).

73. Wu, D. *et al.* The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **8**, (2023).

74. Wimmer, I. *et al.* PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Front. Immunol.* **10**, (2019).

75. Shi, Y., Li, R., Yang, J. & Li, X. No tight junctions in tight junction protein-1 expressing HeLa and fibroblast cells. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **12**, 70–78 (2020).

76. McKenzie, A. T. *et al.* Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Sci. Rep.* **8**, 1–19 (2018).

77. Urich, E., Lazic, S. E., Molnos, J., Wells, I. & Freskgård, P. O. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One* **7**, (2012).

78. Muoio, V., Persson, P. B. & Sendeski, M. M. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol.* **210**, 790–798 (2014).

79. Schaeffer, S. & Iadecola, C. Revisiting the neurovascular unit. *Nat. Neurosci.* **24**, 1198–1209 (2021).

80. Yu, X., Ji, C. & Shao, A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. *Front. Neurosci.* **14**, 1–8 (2020).

81. Armulik, A. *et al.* Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* **468**, 557–561 (2010).

82. Gil, E. *et al.* Pericyte derived chemokines amplify neutrophil recruitment across the cerebrovascular endothelial barrier. *Front. Immunol.* **13**, 1–16 (2022).

83. Rustenhoven, J., Jansson, D., Smyth, L. C. & Dragunow, M. Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 291–304 (2017).

84. Kuchler-Bopp, S., Delaunoy, J. P., Artault, J. C., Zaepfel, M. & Dietrich, J. B. Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport* **10**, 1347–1353 (1999).

85. Janzer, R. C. & Raff, M. C. Astrocytes induce blood–brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* **325**, 253–257 (1987).

86. Verkhratsky, A. & Pivoriūnas, A. Astroglia support, regulate and reinforce brain barriers. *Neurobiol. Dis.* **179**, (2023).

87. Denes, A. *et al.* Endothelial cells and macrophages as allies in the healthy and diseased brain. *Acta Neuropathol.* **147**, (2024).

88. Liu, L. R., Liu, J. C., Bao, J. S., Bai, Q. Q. & Wang, G. Q. Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit. *Front. Immunol.* **11**, 1–11 (2020).

89. Ding, Z. *et al.* Emerging Roles of Microglia in Neuro-vascular Unit: Implications of Microglia-Neurons Interactions. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 1–9 (2021).

90. Xu, L., Nirwane, A. & Yao, Y. Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke Vasc. Neurol.* **4**, 78–82 (2019).

91. Rauti, R., Renous, N. & Maoz, B. M. Mimicking the Brain Extracellular Matrix in Vitro: A Review of Current Methodologies and Challenges. *Isr. J. Chem.* **60**, 1141–1151 (2020).

92. Du, F., Shusta, E. V. & Palecek, S. P. Extracellular matrix proteins in construction and function of in vitro blood-brain barrier models. *Front. Chem. Eng.* **5**, 1–13 (2023).

93. Bhalerao, A. *et al.* In vitro modeling of the neurovascular unit: Advances in the field. *Fluids Barriers CNS* **17**, 1–20 (2020).

94. Patrick, M. K., Johnston, J. B. & Power, C. Lentiviral Neuropathogenesis: Comparative

Neuroinvasion, Neurotropism, Neurovirulence, and Host Neurosusceptibility. *J. Virol.* **76**, 7923–7931 (2002).

95. Wiley, C. A. Emergent viral infections of the CNS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79**, 823–842 (2020).

96. Constant, O. *et al.* Role of Dendritic Cells in Viral Brain Infections. *Front. Immunol.* **13**, 1–15 (2022).

97. Klein, R. S. & Hunter, C. A. Protective and Pathological Immunity during Central Nervous System Infections. *Immunity* **46**, 891–909 (2017).

98. Power, G. M. *et al.* Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus) infections: A systematic literature review and meta-analysis. *BMJ Glob. Heal.* **7**, (2022).

99. Hubálek, Z., Rudolf, I. & Nowotny, N. *Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals*. *Advances in Virus Research* vol. 89 (2014).

100. Das, K., Behera, R. L. & Paital, B. Socio-economic impact of COVID-19. in *COVID-19 in the Environment* 153–190 (Elsevier, 2022). doi:10.1016/B978-0-323-90272-4.00014-2.

101. Peyre, M. *et al.* A Systematic Scoping Study of the Socio-Economic Impact of Rift Valley Fever: Research Gaps and Needs. *Zoonoses Public Health* **62**, 309–325 (2015).

102. Domingo, E. Mechanisms of viral emergence. *Vet. Res.* **41**, (2010).

103. Chrétien, F., Wong, K. T., Sharer, L. R., Keohane, C. & Gray, F. *Infections of the central nervous system: Pathology and genetics*. *Infections of the Central Nervous System: Pathology and Genetics* (2020). doi:10.1002/9781119467748.

104. Howley, P. M., Knipe, D. M. & Whelan, S. P. J. *Fields virology. Volume 1, Emerging viruses*. (Wolters Kluwer, 2020).

105. Venter, M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. *Curr. Opin. Virol.* **28**, 74–84 (2018).

106. Huang, Y.-J. S., Higgs, S. & Vanlandingham, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Curr. Opin. Virol.* **34**, 104–109 (2019).

107. Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. A. & Failloux, A.-B. B. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front. Microbiol.* **12**, 1–24 (2021).

108. Clé, M. *et al.* Neurocognitive impacts of arbovirus infections. *J. Neuroinflammation* **17**, 233 (2020).

109. Chauhan, L. *et al.* Nervous System Manifestations of Arboviral Infections. *Curr. Trop. Med. Reports* (2022) doi:10.1007/s40475-022-00262-9.

110. Velandia, M. L. & Castellanos, J. E. Flavivirus Neurotropism, Neuroinvasion, Neurovirulence and Neurosusceptibility: Clues to Understanding Flavivirus- and Dengue-Induced Encephalitis. in *Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions* (InTech, 2012). doi:10.5772/26571.

111. Sips, G. J., Wilschut, J. & Smit, J. M. Neuroinvasive flavivirus infections. 69–87 (2012) doi:10.1002/rmv.

112. Gossner, C. M. *et al.* Arthropod-borne diseases among travellers arriving in Europe from Africa, 2015 to 2019. *Euro Surveill.* **28**, 1–14 (2023).

113. Cavicchioli, R. *et al.* Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 569–586 (2019).

114. Holmes, E. C. The Ecology of Viral Emergence. *Annu. Rev. Virol.* **9**, 173–192 (2022).

115. Alvarez-Munoz, S., Upegui-Porras, N., Gomez, A. P. & Ramirez-Nieto, G. Key Factors That Enable the Pandemic Potential of RNA Viruses and Inter-Species Transmission: A Systematic Review. *Viruses* **13**, 537 (2021).

116. de Bernardi Schneider, A. & Wolfinger, M. T. The role of Arbovirus genome untranslated regions on neurotropism. *Int. J. Infect. Dis.* **79**, 142 (2019).

117. Girard, M., Nelson, C. B., Picot, V. & Gubler, D. J. Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine* **38**, 3989–3994 (2020).

118. Broertjes, J. *et al.* Epidemiology of Pathogens Listed as Potential Bioterrorism Agents, the Netherlands, 2009-2019. *Emerg. Infect. Dis.* **29**, E1–E9 (2023).

119. Balakrishnan, V. S. WHO launches global initiative for arboviral diseases. *The Lancet Microbe* **3**, e407 (2022).

120. McEntire, C. R. S. *et al.* Neurologic Manifestations of the World Health Organization's List of Pandemic and Epidemic Diseases. *Front. Neurol.* **12**, (2021).

121. Thomson, M. C., Muñoz, Á. G., Cousin, R. & Shumake-Guillemot, J. Climate drivers of vector-borne diseases in Africa and their relevance to control programmes. *Infect. Dis. Poverty* **7**, 1–22 (2018).

122. Abdullahi, A. M., Sarmast, S. T. & Singh, R. Molecular Biology and Epidemiology of Neurotropic Viruses. *Cureus* **12**, (2020).

123. Ludlow, M. *et al.* Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol.* **131**, 159–184 (2016).

124. Soung, A. & Klein, R. S. Viral Encephalitis and Neurologic Diseases: Focus on Astrocytes. *Trends Mol. Med.* **24**, 950–962 (2018).

125. Wouk, J., Rechenchoski, D. Z., Rodrigues, B. C. D., Ribelato, E. V. & Faccin-Galhardi, L. C. Viral infections and their relationship to neurological disorders. *Arch. Virol.* **166**, 733–753 (2021).

126. Wongchitrat, P., Chanmee, T. & Govitrapong, P. Molecular Mechanisms Associated with Neurodegeneration of Neurotropic Viral Infection. *Mol. Neurobiol.* **61**, 2881–2903 (2024).

127. Wraith, D. C. & Nicholson, L. B. The adaptive immune system in diseases of the central nervous system. *J. Clin. Invest.* **122**, 1172–1179 (2012).

128. Bengue, M. *et al.* Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes. *Viruses* **13**, 1–17 (2021).

129. Gaume, L. *et al.* Enterovirus A71 crosses a human blood–brain barrier model through infected immune cells. **12**, (2024).

130. Han, S. *et al.* Emerging concerns of blood-brain barrier dysfunction caused by

neurotropic enteroviral infections. *Virology* **591**, 109989 (2024).

131. Salimi, H., Cain, M. D. & Klein, R. S. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. *Neurotherapeutics* **13**, 514–534 (2016).

132. Diamond, M. S. *West Nile Encephalitis Virus Infection*. *West Nile Virus: Molecular Epidemiology and Diversity* (Springer New York, 2009). doi:10.1007/978-0-387-79840-0.

133. Acharya, A. *et al.* Proteomic landscape of astrocytes and pericytes infected with HIV/SARS-CoV-2 mono/co-infection, impacting on neurological complications. *Res. Sq.* 1–25 (2023).

134. Cain, M. D., Salimi, H., Diamond, M. S. & Klein, R. S. Mechanisms of Pathogen Invasion into the Central Nervous System. *Neuron* **103**, 771–783 (2019).

135. Le Govic, Y., Demey, B., Cassereau, J., Bahn, Y.-S. S. & Papon, N. Pathogens infecting the central nervous system. *PLOS Pathog.* **18**, e1010234 (2022).

136. Srichawla, B. S. *et al.* Stealth invaders: unraveling the mystery of neurotropic viruses and their elusive presence in cerebrospinal fluid – a comprehensive review. *Ann. Med. Surg.* **85**, 2761–2766 (2023).

137. Srichawla, B. S. *et al.* Neuroinvasion of emerging and re-emerging arboviruses: A scoping review. *SAGE Open Med.* **12**, (2024).

138. Salinas, S., Schiavo, G. & Kremer, E. J. A hitchhiker's guide to the nervous system: the complex journey of viruses and toxins. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 645–655 (2010).

139. Koyuncu, O. O., Hogue, I. B. & Enquist, L. W. Virus infections in the nervous system. *Cell Host Microbe* **13**, 379–393 (2013).

140. Hsieh, J. T. & St John, A. L. Japanese encephalitis virus and its mechanisms of neuroinvasion. *PLoS Pathog.* **16**, 1–6 (2020).

141. Marshall, E. M., Koopmans, M. & Rockx, B. Usutu virus and West Nile virus use a transcellular route of neuroinvasion across an in vitro model of the human blood-brain barrier. *bioRxiv* 2024.01.26.577380 (2024).

142. Constant, O. *et al.* Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood–brain barrier integrity. *Emerg. Microbes Infect.* **12**, (2023).

143. Clé, M. *et al.* Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. *MBio* **11**, (2020).

144. Mustafá, Y. M., Meuren, L. M., Coelho, S. V. A. & De Arruda, L. B. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).

145. Simonin, Y. *et al.* Zika virus induces strong inflammatory responses and impairs homeostasis and function of the human retinal pigment epithelium. *EBioMedicine* **39**, 315–331 (2019).

146. Stüdle, C. *et al.* SARS-CoV-2 infects epithelial cells of the blood-cerebrospinal fluid barrier rather than endothelial cells or pericytes of the blood-brain barrier. *Fluids*

Barriers CNS **20**, 1–21 (2023).

147. de Vries, L. & Harding, A. T. Mechanisms of Neuroinvasion and Neuropathogenesis by Pathologic Flaviviruses. *Viruses* **15**, 261 (2023).

148. Martinez, T. E., Mayilsamy, K., Mohapatra, S. S. & Mohapatra, S. Modulation of Paracellular Permeability in SARS-CoV-2 Blood-to-Brain Transcytosis. *Viruses* **16**, 785 (2024).

149. Suen, W. W., Prow, N. A., Hall, R. A. & Bielefeldt-ohmann, H. Mechanism of West Nile Virus Neuroinvasion: A Critical Appraisal. 2796–2825 (2014) doi:10.3390/v6072796.

150. Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S. & Nerurkar, V. R. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* **397**, 130–138 (2010).

151. Talmi-Frank, D. *et al.* Extracellular Matrix Proteolysis by MT1-MMP Contributes to Influenza-Related Tissue Damage and Mortality. *Cell Host and Microbe* vol. 20 458–470 at https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.005 (2016).

152. Al-Obaidi, M. M. J., Muthanna, A. & Desa, M. N. M. Nipah Virus Neurotropism: Insights into Blood-Brain Barrier Disruption. *J. Integr. Neurosci.* **23**, 90 (2024).

153. Hou, J., Baker, L. A., Zhou, L. & Klein, R. S. Viral interactions with the blood-brain barrier: old dog, new tricks. *Tissue Barriers* **4**, e1142492 (2016).

154. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. . & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology, 10th Edition*. (Elsevier, 2022).

155. Harris-Tryon, T. A. & Grice, E. A. Microbiota and maintenance of skin barrier function. *Science (80-.).* **376**, 940–945 (2022).

156. Takiishi, T., Fenero, C. I. M. & Câmara, N. O. S. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers* **5**, e1373208 (2017).

157. Chowdhury, M. A., Hossain, N., Kashem, M. A., Shahid, M. A. & Alam, A. Immune response in COVID-19: A review. *J. Infect. Public Health* **13**, 1619–1629 (2020).

158. Bernaudin, J.-F., Kambouchner, M. & Lacave, R. La circulation lymphatique, structure des vaisseaux, développement, formation de la lymphe. Revue générale. *Rev. Pneumol. Clin.* **69**, 93–101 (2013).

159. Murúa, S. R., Farez, M. F. & Quintana, F. J. The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **17**, 121–139 (2021).

160. Nüssing, S., Sutton, V. R., Trapani, J. A. & Parish, I. A. Beyond target cell death – Granzyme serine proteases in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **88**, 101152 (2022).

161. Chawla-Sarkar, M. *et al. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis*. *Apoptosis* vol. 8 (2003).

162. Liu, J., Zhang, X., Cheng, Y. & Cao, X. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2461–2471 (2021).

163. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545 (2014).

164. Daniels, B. P. *et al.* Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *MBio* **5**, (2014).

165. Schoggins, J. W. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu. Rev. Virol.* **6**, 567–584 (2019).

166. Ketelut-Carneiro, N. & Fitzgerald, K. A. Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *J. Mol. Biol.* **434**, (2022).

167. Nguyen, L. N. & Kanneganti, T. D. PANoptosis in Viral Infection: The Missing Puzzle Piece in the Cell Death Field. *J. Mol. Biol.* **434**, 167249 (2022).

168. Hemann, E. A., Gale, M. & Savan, R. Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

169. Muldoon, L. L. *et al.* Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 13–21 (2013).

170. Dunn, G. P. & Okada, H. Principles of immunology and its nuances in the central nervous system. *Neuro. Oncol.* **17**, 3–8 (2015).

171. Marchetti, L. & Engelhardt, B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. *Vasc. Biol.* **2**, H1–H18 (2020).

172. McGavern, D. B. & Kang, S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 318–329 (2011).

173. Ransohoff, R. M. & Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 623–635 (2012).

174. Miner, J. J. & Diamond, M. S. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Curr. Opin. Immunol.* **38**, 18–23 (2016).

175. Dyatlova, A. S., Novikova, N. S., Yushkov, B. G., Korneva, E. A. & Chereshnev, V. A. The Blood−Brain Barrier in Neuroimmune Interactions and Pathological Processes. *Her. Russ. Acad. Sci.* **92**, 590–599 (2022).

176. Rudziak, P., Ellis, C. G. & Kowalewska, P. M. Role and molecular mechanisms of pericytes in regulation of leukocyte diapedesis in inflamed tissues. *Mediators Inflamm.* **2019**, (2019).

177. Telikani, Z., Monson, E. A., Hofer, M. J. & Helbig, K. J. Antiviral response within different cell types of the CNS. 1–16 (2022) doi:10.3389/fimmu.2022.1044721.

178. Lazear, H. M., Nice, T. J. & Diamond, M. S. Interferon-λ: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* **43**, 15–28 (2015).

179. Lazear, H. M. *et al.* Interferon-λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).

180. Farina, C., Aloisi, F. & Meinl, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* **28**, 138–145 (2007).

181. Jorgačevski, J. & Potokar, M. Immune Functions of Astrocytes in Viral Neuroinfections. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).

182. Daniels, B. P. *et al.* Regional astrocyte IFN signaling restricts pathogenesis during neurotropic viral infection. *J. Clin. Invest.* **127**, 843–856 (2017).

183. Horng, S. *et al.* Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **127**, 3136–3151 (2017).

184. Schonhoff, A. M., Williams, G. P., Wallen, Z. D., Standaert, D. G. & Harms, A. S. *Innate and adaptive immune responses in Parkinson's disease*. *Progress in Brain Research* vol. 252 (Elsevier B.V., 2020).

185. Wang, C., Li, J., Liu, Y., Sun, Q. & Liu, Z. Pathogenesis of enterovirus infection in central nervous system. *Biosaf. Heal.* **5**, 233–239 (2023).

186. Dawes, B. E. *et al.* Human neural stem cell-derived neuron/astrocyte co-cultures respond to la Crosse virus infection with proinflammatory cytokines and chemokines 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology 11 Medical and Health Sciences 1109 Neurosciences. *J. Neuroinflammation* **15**, (2018).

187. Hong, S. & Banks, W. A. Role of the Immune System in HIV-associated Neuroinflammation and Neurocognitive Implications. *Brain Behav Immun.* **23**, 1–7 (2016).

188. Salomão, N. *et al.* Fatal Dengue Cases Reveal Brain Injury and Viral Replication in Brain-Resident Cells Associated with the Local Production of Pro-Inflammatory Mediators. *Viruses* **12**, 603 (2020).

189. Pavesi, A. *et al.* Inflammatory Response Associated with West Nile Neuroinvasive Disease: A Systematic Review. *Viruses* **16**, (2024).

190. Yadav, P. *et al.* Molecular Mechanism and Role of Japanese Encephalitis Virus Infection in Central Nervous System-Mediated Diseases. *Viruses* **14**, 1–25 (2022).

191. Hill, J. M., Clement, C., Zhao, Y. & Lukiw, W. J. Induction of the pro-inflammatory NF-kB-sensitive miRNA-146a by human neurotrophic viruses. *Frontiers in Microbiology* vol. 6 at https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00043 (2015).

192. Zhong, H., Liu, T., Shang, Y., Huang, C. & Pan, S. Breaking the vicious cycle: Targeting the NLRP3 inflammasome for treating sepsis-associated encephalopathy. *Biomed. Pharmacother.* **177**, 117042 (2024).

193. Klein, R. S. *et al.* Neuroinflammation During RNA Viral Infections. *Annu. Rev. Immunol.* **37**, 73–95 (2019).

194. Patrycy, M., Chodkowski, M. & Krzyzowska, M. Role of Microglia in Herpesvirus-Related Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Pathogens* **11**, (2022).

195. Ramesh, G., MacLean, A. G. & Philipp, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm.* **2013**, 480739 (2013).

196. Hosking, M. P. & Lane, T. E. The Role of Chemokines during Viral Infection of the CNS. *PLoS Pathog.* **6**, e1000937 (2010).

197. Mohapatra, S., Chakraborty, T. & Basu, A. Japanese Encephalitis virus infection in astrocytes modulate microglial function: Correlation with inflammation and oxidative stress. *Cytokine* **170**, 156328 (2023).

198. Cevallos, C. *et al.* HIV-induced bystander cell death in astrocytes requires cell-to-cell viral transmission. *J. Neurochem.* **163**, 338–356 (2022).

199. Yu, X. *et al.* Exploring New Mechanism of Depression from the Effects of Virus on Nerve Cells. *Cells* **12**, 1–19 (2023).

200. Galea, I. The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2489–2501 (2021).

201. Stasenko, S. V., Hramov, A. E. & Kazantsev, V. B. Loss of neuron network coherence induced by virus-infected astrocytes: a model study. *Sci. Rep.* **13**, 1–11 (2023).

202. Kim, S. *et al.* Activation of neurotoxic A1-reactive astrocytes by SFTS virus infection accelerates fatal brain damage in IFNAR1 -/- mice. *J. Med. Virol.* **96**, (2024).

203. Lin, X. *et al.* Network analysis between neuron dysfunction and neuroimmune response based on neural single-cell transcriptome of COVID-19 patients. *Comput. Biol. Med.* **150**, 106055 (2022).

204. Chen, Z. & Li, G. Immune response and blood–brain barrier dysfunction during viral neuroinvasion. *Innate Immun.* **27**, 109–117 (2021).

205. Keep, R. F. *et al.* Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: Changes, mechanisms and therapeutic targets. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **38**, 1255–1275 (2018).

206. Coisne, C. & Engelhardt, B. Tight Junctions in Brain Barriers During Central Nervous System Inflammation. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1285–1303 (2011).

207. Yamazaki, Y. *et al.* ApoE (Apolipoprotein E) in Brain Pericytes Regulates Endothelial Function in an Isoform-Dependent Manner by Modulating Basement Membrane Components. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 128–144 (2020).

208. Kose, N. *et al.* Altered expression of basement membrane-related molecules in rat brain pericyte, endothelial, and astrocyte cell lines after transforming growth factor-beta1 treatment. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **22**, 255–266 (2007).

209. Tohidpour, A. *et al.* Neuroinflammation and infection: Molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).

210. Bonetto, V. *et al.* Markers of blood-brain barrier disruption increase early and persistently in COVID-19 patients with neurological manifestations. *Frontiers in Immunology* vol. 13 at https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1070379 (2022).

211. Xiao, M., Xiao, Z. J., Yang, B., Lan, Z. & Fang, F. Blood-Brain Barrier: More Contributor to Disruption of Central Nervous System Homeostasis Than Victim in Neurological Disorders. *Front. Neurosci.* **14**, 1–17 (2020).

212. Bhowmick, S. *et al.* Induction of IP-10 (CXCL10) in astrocytes following Japanese encephalitis. *Neurosci. Lett.* **414**, 45–50 (2007).

213. Quellec, J., Salinas, S., Simonin, Y. & Cêtre-Sossah, C. Rift valley fever virus infection: Physiopathology and pathogenesis. *Virologie* **25**, 263–279 (2021).

214. Javelle, E. *et al.* The challenging management of Rift Valley Fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **19**, 4 (2020).

215. Bird, B. H., Ksiazek, T. G., Nichol, S. T. & Maclachlan, ; N James. *Rift Valley fever virus*. *JAVMA* vol. 234 (2009).

216. Rich, K. M. & Wanyoike, F. An assessment of the regional and national socio-economic impacts of the 2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 52–57 (2010).

217. Tinto, B. *et al.* Rift Valley fever in West Africa: A zoonotic disease with multiple socio-economic consequences. *One Heal.* **17**, (2023).

218. Zeller, H. & Bouloy, M. *Infections by viruses of the families Bunyaviridae and Filoviridae*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* vol. 19 (2000).

219. Nielsen, S. S. *et al.* Rift valley fever: Risk of persistence, spread and impact in Mayotte (France). *EFSA J.* **18**, 1–61 (2020).

220. WOAH. Fièvre de la Vallée du Rift. (2024).

221. WHO. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts. https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts (2024).

222. CDC, U. C. for D. C. and P. Bioterrorism Agents/Diseases. https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp (2024).

223. Code de la santé Publique. Chapitre IX: Micro-organismes et toxines. *Article L5139-1* https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000025104612 (2012).

224. Daubney, R., Hudson, J. R. & Garnham, P. C. Enzootic hepatitis or rift valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from east africa. *J. Pathol. Bacteriol.* **34**, 545–579 (1931).

225. McMillen, C. M. & Hartman, A. L. Rift Valley fever in animals and humans: Current perspectives. *Antiviral Res.* **156**, 29–37 (2018).

226. Gerdes, G. H. *Rift Valley fever*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* vol. 23 (2004).

227. Kenawy, M. A., Abdel-Hamid, Y. M. & Beier, J. C. Rift Valley Fever in Egypt and other African countries: Historical review, recent outbreaks and possibility of disease occurrence in Egypt. *Acta Tropica* vol. 181 40–49 at https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.015 (2018).

228. Arsevska, E. *et al.* Identifying Areas Suitable for the Occurrence of Rift Valley Fever in North Africa: Implications for Surveillance. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, 658–674 (2016).

229. Kardjadj, M., Diallo, A. & Lancelot, R. *Transboundary Animal Diseases in Sahelian Africa and Connected Regions*. (2019).

230. WHO. Disease Outbreak News. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news (2024).

231. WOAH. WAHIS : World Animal Health Information System. https://wahis.woah.org/#/home (2024).

232. Métras, R. *et al.* Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic. *PNAS* (2020) doi:10.1073/pnas.2004468117/-/DCSupplemental.

233. Youssouf, H. *et al.* Rift Valley fever outbreak, Mayotte, France, 2018–2019. *Emerging*

Infectious Diseases vol. 26 769–772 at https://doi.org/10.3201/eid2604.191147 (2020).

234. Gibson, S. *et al.* The increasing threat of Rift Valley fever virus globalization: strategic guidance for protection and preparation. *J. Med. Entomol.* **60**, 1197–1213 (2023).

235. Situma, S. *et al.* Widening geographic range of Rift Valley fever disease clusters associated with climate change in East Africa. *BMJ Glob. Heal.* **9**, e014737 (2024).

236. Elliott, R. M. & Brennan, B. Emerging phleboviruses. *Curr. Opin. Virol.* **5**, 50–57 (2014).

237. Kwaśnik, M., Rożek, W. & Rola, J. Rift Valley fever - A growing threat to humans and animals. *Journal of Veterinary Research (Poland)* vol. 65 7–14 at https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0009 (2021).

238. Wang, Z. *et al.* Increasing evolution, prevalence, and outbreaks for rift valley fever virus in the process of breaking geographical barriers. *Sci. Total Environ.* **917**, 170302 (2024).

239. Lapa, D. *et al.* Detection of Anti-Rift Valley Fever Virus Antibodies in Serum Samples of Patients with Suspected Arbovirus Infection. *Microorganisms* **11**, 1–7 (2023).

240. Leblebicioglu, H., Beeching, N. & Petersen, E. *Emerging and Re-emerging Infections in Travellers*. *Emerging and Re-emerging Infections in Travellers* (Springer International Publishing, 2024). doi:10.1007/978-3-031-49475-8.

241. Kassiri, H., Dehghani, R., Kasiri, M. & Dehghani, M. Neglected Tropical Disease of Rift Valley Fever and Its Impact on Human, and Animal Health with Emphasis on Iran: A Review Article.

242. Massart, S., Antonio, O., Jijakli, H. & Candresse, T. Diagnostic des viroses et séquençage haut débit : vers un changement de paradigme ? *Virol. (Montrouge, Fr.* **18**, 247–250 (2014).

243. Sasaya, T. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Phenuiviridae 2023. *J. Gen. Virol.* **104**, 1–2 (2023).

244. Adams, M. J. *et al.* Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch. Virol.* **162**, 2505–2538 (2017).

245. Abudurexiti, A. *et al.* Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Arch. Virol.* **164**, 1949–1965 (2019).

246. Maes, P. *et al.* Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch. Virol.* **163**, 2295–2310 (2018).

247. Bird, B. H., Khristova, M. L., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. & Nichol, S. T. Complete Genome Analysis of 33 Ecologically and Biologically Diverse Rift Valley Fever Virus Strains Reveals Widespread Virus Movement and Low Genetic Diversity due to Recent Common Ancestry. *J. Virol.* **81**, 2805–2816 (2007).

248. Grobbelaar, A. A. *et al.* Molecular epidemiology of rift valley fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 2270–2276 (2011).

249. Ikegami, T. *et al.* Distinct virulence of Rift Valley fever phlebovirus strains from different genetic lineages in a mouse model. *PLoS One* **12**, e0189250 (2017).

250. Liu, J. *et al.* The first imported case of Rift Valley fever in China reveals a genetic reassortment of different viral lineages. *Emerg. Microbes Infect.* **6**, 1–7 (2017).

251. Gaudreault, N. N., Indran, S. V., Balaraman, V., Wilson, W. C. & Richt, J. A. Molecular aspects of Rift Valley fever virus and the emergence of reassortants. *Virus Genes* **55**, 1–11 (2019).

252. Wright, D., Kortekaas, J., Bowden, T. A. & Warimwe, G. M. Rift Valley fever: biology and epidemiology. *J. Gen. Virol.* **100**, 1187–1199 (2019).

253. Freiberg, A. N., Sherman, M. B., Morais, M. C., Holbrook, M. R. & Watowich, S. J. Three-Dimensional Organization of Rift Valley Fever Virus Revealed by Cryoelectron Tomography. *J. Virol.* **82**, 10341–10348 (2008).

254. Ellis, D. S., Simpson, D. I. H., Stamford, S. & Wahab, K. S. E. A. Rift Valley Fever Virus: Some Ultrastructural Observations on Material from the Outbreak in Egypt 1977. *J. Gen. Virol.* **42**, 329–337 (1979).

255. Wichgers Schreur, P. J., Kormelink, R. & Kortekaas, J. Genome packaging of the Bunyavirales. *Curr. Opin. Virol.* **33**, 151–155 (2018).

256. Uckeley, Z. M., Koch, J., Tischler, N. D., Léger, P. & Lozach, P.-Y. Y. Entrée cellulaire des phlébovirus chez l'hôte mammifère. *Virol. (Montrouge, Fr.* **23**, 176–187 (2019).

257. Wu, Y. *et al.* Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E7564–E7573 (2017).

258. Uckeley, Z. M., Koch, J., Tischler, N. D., Léger, P. & Lozach, P. Y. Entrée cellulaire des phlébovirus chez l'hôte mammifère. *Virologie (Montrouge, France)* vol. 23 176–187 at https://doi.org/10.1684/vir.2019.0780 (2019).

259. Lozach, P.-Y. *et al.* DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell host {\&} microbe* **10**, 75–88 (2011).

260. de Boer, S. M. *et al.* Heparan Sulfate Facilitates Rift Valley Fever Virus Entry into the Cell. *J. Virol.* **86**, 13767–13771 (2012).

261. Léger, P. *et al.* Differential Use of the C-Type Lectins L-SIGN and DC-SIGN for Phlebovirus Endocytosis. *Traffic* **17**, 639–656 (2016).

262. Ganaie, S. S. *et al.* Lrp1 is a host entry factor for Rift Valley fever virus. *Cell* **184**, 5163-5178.e24 (2021).

263. Schwarz, M. M. *et al.* Lrp1 is essential for lethal Rift Valley fever hepatic disease in mice. *Sci. Adv.* **9**, 1–10 (2023).

264. He, Z., Wang, G., Wu, J., Tang, Z. & Luo, M. The molecular mechanism of LRP1 in physiological vascular homeostasis and signal transduction pathways. *Biomed. Pharmacother.* **139**, 111667 (2021).

265. Harmon, B. *et al.* Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis. *J. Virol.* **86**, 12954–12970 (2012).

266. Wichgers Schreur, P. J. & Kortekaas, J. Single-Molecule FISH Reveals Non-selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments. *PLOS Pathog.* **12**, e1005800 (2016).

267. Filone, C. M., Heise, M., Doms, R. W. & Bertolotti-Ciarlet, A. Development and characterization of a Rift Valley fever virus cell-cell fusion assay using alphavirus replicon vectors. *Virology* **356**, 155–164 (2006).

268. de Boer, S. M. *et al.* Acid-Activated Structural Reorganization of the Rift Valley Fever Virus Gc Fusion Protein. *J. Virol.* **86**, 13642–13652 (2012).

269. Dessau, M. & Modis, Y. Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 1696–1701 (2013).

270. Balaraman, V. *et al.* Identification of Host Factors for Rift Valley Fever Phlebovirus. *Viruses* **15**, 1–13 (2023).

271. Hackett, B. A. *et al.* RNASEK is required for internalization of diverse acid-dependent viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 7797–7802 (2015).

272. Bracci, N. *et al.* CK1 and PP1 regulate Rift Valley fever virus genome replication through L protein phosphorylation. *Antiviral Res.* **226**, 105895 (2024).

273. Gauliard, N., Billecocq, A., Flick, R. & Bouloy, M. Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis. *Virology* **351**, 170–179 (2006).

274. Jérôme, H. *et al.* Rift Valley fever virus minigenome system for investigating the role of L protein residues in viral transcription and replication. *J. Gen. Virol.* **100**, 1093–1098 (2019).

275. Wang, X., Yuan, Y., Liu, Y. & Zhang, L. Arm race between Rift Valley fever virus and host. *Front. Immunol.* **13**, 1–10 (2022).

276. Bouloy, M. Molecular Biology of Rift Valley Fever Virus. *Open Virol. J.* **4**, 8–14 (2010).

277. Shalamova, L. *et al.* Nucleocapsids of the Rift Valley fever virus ambisense S segment contain an exposed RNA element in the center that overlaps with the intergenic region. *Nat. Commun.* **15**, 7602 (2024).

278. Won, S., Ikegami, T., Peters, C. J. & Makino, S. NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J. Virol.* **81**, 13335–13345 (2007).

279. Ly, H. J. & Ikegami, T. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins. *Virol. J.* **13**, 118 (2016).

280. Le May, N. *et al.* A SAP30 complex inhibits IFN-β expression in rift valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog.* **4**, 0134–0144 (2008).

281. Bouloy, M. *et al.* Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs. *J. Virol.* **75**, 1371–1377 (2001).

282. Bracci, N. *et al.* Rift Valley fever virus Gn V5-epitope tagged virus enables identification of UBR4 as a Gn interacting protein that facilitates Rift Valley fever virus production. *Virology* **567**, 65–76 (2022).

283. Uckeley, Z. M. *et al.* Quantitative Proteomics of Uukuniemi Virus-host Cell Interactions Reveals GBF1 as Proviral Host Factor for Phleboviruses. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 2401–2417 (2019).

284. Kuno, G. & Chang, G. J. J. Biological transmission of arboviruses: Reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their

evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 608–637 (2005).

285. Chevalier, V., Pépin, M., Plée, L. & Lancelot, R. Rift Valley fever - a threat for Europe? *Euro Surveill.* **15**, 1 (2010).

286. Lumley, S. *et al.* Rift Valley fever virus: strategies for maintenance, survival and vertical transmission in mosquitoes. *J. Gen. Virol.* **98**, 875–887 (2017).

287. Linthicum, K. J., Davies, F. G., Kairo, A. & Bailey, C. L. Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J. Hyg. (Lond).* **95**, 197–209 (1985).

288. Christophers, S. R. Aedes Aegypti The Yellow Fever Mosquito, Its Life History, Bionomics And Structure. *Nature* **167**, 813–814 (1960).

289. Olive, M.-M., Goodman, S. M. & Reynes, J.-M. The role of mammals in the maintenance of Rift Valley fever virus. *J. Wildl. Dis.* **48**, 241–266 (2012).

290. Oelofsen, M. J. & Van der Ryst, E. Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus? *Onderstepoort J. Vet. Res.* **66**, 51–4 (1999).

291. Beechler, B. R. *et al.* Rift valley fever in Kruger national park: Do buffalo play a role in the inter-epidemic circulation of virus? *Transbound. Emerg. Dis.* **62**, 24–32 (2015).

292. Manore, C. A. & Beechler, B. R. Inter-epidemic and between-season persistence of rift valley fever: vertical transmission or cryptic cycling? *Transbound. Emerg. Dis.* **62**, 13–23 (2015).

293. Michel, A. L. & Bengis, R. G. The African buffalo: A villain for inter-species spread of infectious diseases in southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res* **79**, (2012).

294. Britch, S. C. *et al.* Rift Valley Fever Risk Map Model and Seroprevalence in Selected Wild Ungulates and Camels from Kenya. *PLoS One* **8**, (2013).

295. Bird, B. H. & McElroy, A. K. Rift Valley fever virus: Unanswered questions. *Antiviral Res.* **132**, 274–280 (2016).

296. Linthicum, K. J., Britch, S. C. & Anyamba, A. Rift Valley Fever: An Emerging Mosquito-Borne Disease∗. *Annual Review of Entomology* vol. 61 395–415 at https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023819 (2016).

297. Mulot, M. l., Boissinot, S. & Brault, V. Transmission of plant and vertebrate viruses by arthropods. *Virologie* vol. 24 177–192 at https://doi.org/10.1684/vir.2020.0845 (2020).

298. Brustolin, M. *et al.* Rift Valley fever virus and European mosquitoes: vector competence of Culex pipiens and Stegomyia albopicta (= Aedes albopictus). *Med. Vet. Entomol.* **31**, 365–372 (2017).

299. Turell, M. J., Wilson, W. C. & Bennett, K. E. Potential for North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit rift Valley fever virus. *J. Med. Entomol.* **47**, 884–889 (2010).

300. Hoch, A. L., Bailey, C. L. & Gargan, T. P. Mechanical Transmission of Rift Valley Fever Virus by Hematophagous Diptera *. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 188–193 (1985).

301. Wichgers Schreur, P. J. *et al.* Co-housing of Rift Valley Fever Virus Infected Lambs with Immunocompetent or Immunosuppressed Lambs Does Not Result in Virus

Transmission. *Front. Microbiol.* **7**, 1–9 (2016).

302. Busquets, N. *et al.* Experimental Infection of Young Adult European Breed Sheep with Rift Valley Fever Virus Field Isolates. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **10**, 689–696 (2010).

303. Pepin, M., Bouloy, M., Bird, B. H., Kemp, A. & Paweska, J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): An update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Veterinary Research* vol. 41 at https://doi.org/10.1051/vetres/2010033 (2010).

304. Morrill, J. C. & McClain, D. J. Epidemiology and Pathogenesis of Rift Valley Fever and Other Phleboviruses. *The Bunyaviridae* 281–293 (1996) doi:10.1007/978-1-4899-1364-7_12.

305. Hartman, A. Rift Valley Fever. *Clinics in Laboratory Medicine* vol. 37 285–301 at https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.004 (2017).

306. Van Vuren, P. J. *et al.* Human Cases of Rift Valley Fever in South Africa, 2018. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **18**, 713–715 (2018).

307. LaBeaud, A. D. *et al.* Factors Associated with Severe Human Rift Valley Fever in Sangailu, Garissa County, Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003548 (2015).

308. Jouan, A. *et al.* ANALYTICAL STUDY OF A RIFT VALLEY FEVER EPIDEMIC. 175–186 (1989).

309. McMillen, C. M. & Hartman, A. L. Rift Valley Fever: a Threat to Pregnant Women Hiding in Plain Sight? *J. Virol.* **95**, (2021).

310. Paweska, J. T. Rift Valley Fever. in *Emerging Infectious Diseases* vol. 10 73–93 (Elsevier, 2014).

311. Evans, A. *et al.* Prevalence of antibodies against Rift Valley fever virus in Kenyan wildlife. *Epidemiol. Infect.* **136**, 1261–1269 (2008).

312. Lubisi, B. A. *et al.* Seroprevalence of Rift valley fever in South African domestic and wild suids (1999–2016). *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 811–821 (2020).

313. Van den Bergh, C., Venter, E. H., Swanepoel, R., Hanekom, C. C. & Thompson, P. N. Neutralizing antibodies against Rift Valley fever virus in wild antelope in far northern KwaZulu-Natal, South Africa, indicate recent virus circulation. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 1356–1363 (2020).

314. Wilson, W. C. *et al.* Susceptibility of white-tailed deer to Rift valley fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1717–1719 (2018).

315. Kading, R. C. *et al.* Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **8**, (2018).

316. Rissmann, M. *et al.* Replication of rift valley fever virus in amphibian and reptile-derived cell lines. *Pathogens* **10**, (2021).

317. Nafady, A., Bayoumi, A. H., El-Zaher, M. A. & Youssef, M. S. Rift Valley fever : pathological changes on the suspected bufaloe calves and aborted foetuses. *Assiut Vet. Med. J.* **14.2**, 93–100 (1985).

318. Alexander, R. A. Rift valley fever in the Union. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **22**, 105–112 (1951).

319. Weingartl, H. M. *et al.* Rift Valley fever virus incorporates the 78 kDa glycoprotein into virions matured in mosquito C6/36 cells. *PLoS One* **9**, (2014).

320. Terasaki, K. *et al.* Rift valley fever virus 78kda envelope protein attenuates virus replication in macrophage-derived cell lines and viral virulence in mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, (2021).

321. Kading, R. C. *et al.* Deletion of the NSm Virulence Gene of Rift Valley Fever Virus Inhibits Virus Replication in and Dissemination from the Midgut of Aedes aegypti Mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2670 (2014).

322. Laureti, M. *et al.* Rift Valley Fever Virus Primes Immune Responses in Aedes aegypti Cells. *Pathogens* **12**, (2023).

323. Léger, P. & Lozach, P. Y. Bunyaviruses: From transmission by arthropods to virus entry into the mammalian host first-target cells. *Future Virology* vol. 10 859–881 at https://doi.org/10.2217/fvl.15.52 (2015).

324. Léger, P. *et al.* Dicer-2- and Piwi-Mediated RNA Interference in Rift Valley Fever Virus-Infected Mosquito Cells. *J. Virol.* **87**, 1631–1648 (2013).

325. Nfon, C. K., Marszal, P., Zhang, S. & Weingartl, H. M. Innate immune response to rift valley fever virus in goats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).

326. Moutailler, S. *et al.* Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).

327. Davies, F. G. & Martin, V. Recognizing Rift Valley Fever. *Vet. Ital.* **42**, 31–53 (2006).

328. Coetzer, A. W. & Tusin, R. C. *Infectious diseases of livestock*. (Oxford Academic Press, 2004).

329. Coetzer, J. A. The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **44**, 205–211 (1977).

330. Odendaal, L., Clift, S. J., Fosgate, G. T. & Davis, A. S. Lesions and Cellular Tropism of Natural Rift Valley Fever Virus Infection in Adult Sheep. *Vet. Pathol.* **56**, 61–77 (2019).

331. Odendaal, L., Davis, A. S., Fosgate, G. T. & Clift, S. J. Lesions and Cellular Tropism of Natural Rift Valley Fever Virus Infection in Young Lambs. *Vet. Pathol.* **57**, 66–81 (2020).

332. Weingartl, H. M., Miller, M., Nfon, C. & Wilson, W. C. Development of a rift valley fever virus viremia challenge model in sheep and goats. *Vaccine* **32**, 2337–2344 (2014).

333. Coetzer, J. A. The pathology of Rift Valley fever. II. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves and aborted foetuses. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **49**, 11–17 (1982).

334. Wilson, W. C. *et al.* Experimental infection of calves by two genetically-distinct strains of rift valley fever virus. *Viruses* **8**, (2016).

335. Fawzy, M. & Helmy, Y. A. The One Health Approach is Necessary for the Control of Rift Valley Fever Infections in Egypt: A Comprehensive Review. *Viruses* **11**, 139 (2019).

336. Ghaffar, S. A. *et al.* Rift Valley Fever Surveillance in Mobile Sheep Flocks in the Nile Delta. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 1055–1060 (1986).

337. El Mamy, A. B. O. *et al.* Unexpected rift valley fever outbreak, Northern Mauritania. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1894–1896 (2011).

338. Al-Hazmi, M. *et al. Rift Valley Fever in Saudi Arabia • CID*. vol. 36 https://academic.oup.com/cid/article/36/3/245/351435 (2003).

339. Madani, T. A. *et al.* Rift Valley Fever Epidemic in Saudi Arabia: Epidemiological, Clinical, and Laboratory Characteristics. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 1084–1092 (2003).

340. Anywaine, Z. *et al.* Severe morbidity and hospital-based mortality from Rift Valley fever disease between November 2017 and March 2020 among humans in Uganda. *Virol. J.* **21**, 1–13 (2024).

341. de St Maurice, A. *et al.* Rift valley fever viral load correlates with the human inflammatory response and coagulation pathway abnormalities in humans with hemorrhagic manifestations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0006460 (2018).

342. McElroy, A. K., Harmon, J. R., Flietstra, T., Nichol, S. T. & Spiropoulou, C. F. Human biomarkers of outcome following Rift Valley fever virus infection. *J. Infect. Dis.* **218**, 1847–1851 (2018).

343. Ikegami, T. & Makino, S. The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses* **3**, 493–519 (2011).

344. Siam, A. L., Meegan, J. M. & Gharbawi, K. F. Rift Valley fever ocular manifestations: observations during the 1977 epidemic in Egypt. *Br. J. Ophthalmol.* **64**, 366–374 (1980).

345. Oymans, J., Wichgers Schreur, P. J., van Keulen, L., Kant, J. & Kortekaas, J. Rift valley fever virus targets the maternal-foetal interface in ovine and human placentas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**, 1–18 (2020).

346. Arishi, H. M., Aqeel, A. Y. & Al Hazmi, M. M. Vertical transmission of fatal Rift Valley fever in a newborn. *Ann. Trop. Paediatr.* **26**, 251–253 (2006).

347. Adam, I. & Karsany, M. S. Case report: Rift valley fever with vertical transmission in a pregnant Sudanese woman. *J. Med. Virol.* **80**, 929 (2008).

348. Terasaki, K. & Makino, S. Interplay between the Virus and Host in Rift Valley Fever Pathogenesis. *Journal of Innate Immunity* vol. 7 450–458 at https://doi.org/10.1159/000373924 (2015).

349. Ross, T. M., Bhardwaj, N., Bissel, S. J., Hartman, A. L. & Smith, D. R. Animal models of Rift Valley fever virus infection. *Virus Res.* **163**, 417–423 (2012).

350. Xu, Y. *et al.* Natural hosts and animal models for Rift Valley fever phlebovirus. *Front. Vet. Sci.* **10**, 1–11 (2023).

351. Flick, R. & Bouloy, M. *Rift Valley Fever Virus*. *Current Molecular Medicine* vol. 5 (2005).

352. Gommet, C. *et al.* Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).

353. Smith, D. R. *et al.* The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* **407**, 256–267 (2010).

354. Turell, M. J., Cohnstaedt, L. W. & Wilson, W. C. Effect of environmental temperature

on the ability of culex tarsalis and aedes taeniorhynchus (Diptera: Culicidae) to Transmit Rift Valley Fever Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **20**, 454–460 (2020).

355. Hartman, A. L. *et al.* Aerosolized Rift Valley Fever Virus Causes Fatal Encephalitis in African Green Monkeys and Common Marmosets. *J. Virol.* **88**, 2235–2245 (2014).

356. Albe, J. R. *et al.* Neutrophil and macrophage influx into the central nervous system are inflammatory components of lethal Rift Valley fever encephalitis in rats. *PLoS Pathog.* **15**, e1007833 (2019).

357. Walters, A. W. *et al.* Vascular permeability in the brain is a late pathogenic event during Rift Valley fever virus encephalitis in rats. *Virology* **526**, 173–179 (2019).

358. Reed, C. *et al.* 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 Negl. Trop. Dis.* **7**, e2156 (2013).

359. Gray, K. K. *et al.* Chemotactic and inflammatory responses in the liver and brain are associated with pathogenesis of rift valley fever virus infection in the mouse. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).

360. Oreshkova, N. *et al.* Nonspreading rift valley fever virus infection of human dendritic cells results in downregulation of CD83 and full maturation of bystander cells. *PLoS One* **10**, 1–22 (2015).

361. Xu, L. *et al.* Limiting viral replication in hepatocytes alters Rift Valley fever virus disease manifestations. *J. Virol.* **97**, 1–16 (2023).

362. Njenga, M. K. *et al.* Using a field quantitative real-time PCR test to rapidly identify highly viremic rift valley fever cases. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1166–1171 (2009).

363. Odendaal, L., Davis, A. S. & Venter, E. H. Insights into the Pathogenesis of Viral Haemorrhagic Fever Based on Virus Tropism and Tissue Lesions of Natural Rift Valley Fever. *Viruses* **13**, (2021).

364. Jansen van Vuren, P., Tiemessen, C. T. & Paweska, J. T. Anti-nucleocapsid protein immune responses counteract pathogenic effects of Rift Valley fever virus infection in mice. *PLoS One* **6**, (2011).

365. Shieh, W. J. *et al.* Pathologic studies on suspect animal and human cases of Rift Valley fever from an outbreak in Eastern Africa, 2006-2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 38–42 (2010).

366. Reed, C. *et al.* Ultrastructural study of Rift Valley fever virus in the mouse model. *Virology* **431**, 58–70 (2012).

367. Sendler, M., Mayerle, J. & Lerch, M. M. Necrosis, Apoptosis, Necroptosis, Pyroptosis: It Matters How Acinar Cells Die During Pancreatitis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 407–408 (2016).

368. Shlomovitz, I., Zargarian, S., Erlich, Z., Edry-Botzer, L. & Gerlic, M. Distinguishing Necroptosis from Apoptosis. in 35–51 (2018). doi:10.1007/978-1-4939-8754-2_4.

369. Wuerth, J. D. & Weber, F. Phleboviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses* **8**, (2016).

370. do Valle, T. Z. *et al.* A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity

in resistance to Rift Valley fever. *J. Immunol.* **185**, 6146–6156 (2010).

371. Nelson, C. R. *et al.* Human DDX17 unwinds rift valley fever virus non-coding RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–17 (2021).

372. Wonderlich, E. R. *et al.* Peripheral Blood Biomarkers of Disease Outcome in a Monkey Model of Rift Valley Fever Encephalitis. *J. Virol.* **92**, (2018).

373. Wang, Q. *et al.* Neutralization mechanism of human monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus. *Nat. Microbiol.* **4**, 1231–1241 (2019).

374. Allen, E. R. *et al.* A Protective Monoclonal Antibody Targets a Site of Vulnerability on the Surface of Rift Valley Fever Virus. *Cell Rep.* **25**, 3750-3758.e4 (2018).

375. McElroy, A. K. & Nichol, S. T. 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**, 6–12 (2012).

376. van Jansen Vuren, P. *et al.* Serum levels of inflammatory cytokines in Rift Valley fever patients are indicative of severe disease. *Virol. J.* **12**, 159 (2015).

377. Hise, A. G. *et al.* Association of symptoms and severity of rift valley fever with genetic polymorphisms in human innate immune pathways. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003584 (2015).

378. Batista, L. *et al.* Genetic dissection of Rift Valley fever pathogenesis: Rvfs2 locus on mouse chromosome 11 enables survival to early-onset hepatitis. *Sci. Rep.* **10**, (2020).

379. Lathan, R. *et al.* Innate Immune Basis for Rift Valley Fever Susceptibility in Mouse Models. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).

380. Cartwright, H. N. *et al.* Genetic diversity of collaborative cross mice enables identification of novel rift valley fever virus encephalitis model. *PLoS Pathog.* **18**, 1–24 (2022).

381. Lapa, D. *et al.* Rift Valley Fever Virus: An Overview of the Current Status of Diagnostics. *Biomedicines* **12**, (2024).

382. Hanafi, H. A. *et al.* Virus isolations and high population density implicate Culex antennatus (Becker) (Diptera: Culicidae) as a vector of Rift Valley Fever virus during an outbreak in the Nile Delta of Egypt. *Acta Trop.* **119**, 119–24 (2011).

383. Soumaré, P. O. L. *et al.* Phylogeography of Rift Valley Fever Virus in Africa Reveals Multiple Introductions in Senegal and Mauritania. *PLoS One* **7**, e35216 (2012).

384. Trujillo, J. D. *et al.* Rift Valley Fever virus M and L genome segment detection: a comparison of field-deployable reverse transcription insulated isothermal PCR (RT-iiPCR) and laboratory-based multiplex reverse transcription real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **62**, (2024).

385. Balaraman, V. *et al.* RT-qPCR genotyping assays for differentiating Rift Valley fever phlebovirus strains. *J. Virol. Methods* **315**, 114693 (2023).

386. Ayaz Kök, S., Üstün, S. & Taşkent Sezgin, H. Diagnosis of Ruminant Viral Diseases with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Mol. Biotechnol.* (2023) doi:10.1007/s12033-023-00674-6.

387. Park, C., Park, D., Hassan, Z. U., Choi, S. H. & Kim, S. Comparison of RT-qPCR and RT-ddPCR with Rift valley fever virus (RVFV) RNA. *Sci. Rep.* **13**, 3085 (2023).

388. Drolet, B. S. *et al.* Development and evaluation of one-step rRT-PCR and immunohistochemical methods for detection of Rift Valley fever virus in biosafety level 2 diagnostic laboratories. *J. Virol. Methods* **179**, 373–382 (2012).

389. Cêtre-Sossah, C. *et al.* Development and validation of a pen side test for Rift Valley fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007700 (2019).

390. Peyrefitte, C. N. *et al.* Real-Time Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Rift Valley Fever Virus. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3653–3659 (2008).

391. Lean, F. Z. X. & Johnson, N. JMM Profile: Rift Valley fever: a zoonotic viral haemorrhagic disease. *J. Med. Microbiol.* **72**, 1–5 (2022).

392. Nair, N., Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F. & Prajeeth, C. K. Rift Valley Fever Virus — Infection , Pathogenesis and Host. *Pathogens* **12**, (2023).

393. Wichgers Schreur, P. J., Bird, B. H., Ikegami, T., Bermúdez-Méndez, E. & Kortekaas, J. Perspectives of Next-Generation Live-Attenuated Rift Valley Fever Vaccines for Animal and Human Use. *Vaccines* **11**, 1–15 (2023).

394. Alkan, C., Jurado-Cobena, E. & Ikegami, T. Advancements in Rift Valley fever vaccines: a historical overview and prospects for next generation candidates. *npj Vaccines* **8**, 171 (2023).

395. Makoschey, B. *et al.* Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–15 (2016).

396. Lo, M. M. *et al.* Safety and immunogenicity of Onderstepoort Biological Products' Rift Valley fever Clone 13 vaccine in sheep and goats under field conditions in Senegal. *Onderstepoort J Vet Res* **82**, (2015).

397. Kryshchyshyn-Dylevych, A., Kaminskyy, D. & Lesyk, R. In-vitro antiviral screening of some thiopyranothiazoles. *Chem. Biol. Interact.* **386**, 110738 (2023).

398. Jenkin, D. *et al.* Safety and immunogenicity of a ChAdOx1 vaccine against Rift Valley fever in UK adults: an open-label, non-randomised, first-in-human phase 1 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* **23**, 956–964 (2023).

399. Keck, F. *et al.* Characterizing the effect of Bortezomib on Rift Valley Fever Virus multiplication. *Antiviral Res.* **120**, 48–56 (2015).

400. Muralitharan, I., Sahoo, A. K., Augusthian, P. D. & Samal, A. Computational prediction of phytochemical inhibitors against the cap-binding domain of Rift Valley fever virus. *Mol. Divers.* (2023) doi:10.1007/s11030-023-10702-x.

401. Bird, B. H. *et al.* 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. *J. Virol.* **82**, 2681–2691 (2008).

402. Prajeeth, C. K. *et al.* Immune correlates of protection of the four-segmented Rift Valley fever virus candidate vaccine in mice. *Emerg. Microbes Infect.* **13**, (2024).

403. Wichgers Schreur, P. J. *et al.* Safety and immunogenicity of four-segmented Rift Valley fever virus in the common marmoset. *npj Vaccines* **7**, 54 (2022).

404. Leroux-roels, I. *et al.* Safety and immunogenicity of the live-attenuated hRVFV-4s vaccine against Rift Valley fever in healthy adults : a dose- randomised clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* **3099**, (2024).

405. Issae, A. R., Katakweba, A. A. S., Kicheleri, R. P., Chengula, A. A. & Kasanga, C. J. Knowledge, attitudes and practices on rift valley fever among pastoral and agropastoral communities of Ngorongoro in the rift valley ecosystem, Tanzania, conducted in 2021/2022. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **17**, 1–21 (2023).

406. Kasye, M., Teshome, D., Abiye, A. & Eshetu, A. A Review on Rift Valley Fever on Animal , Human Health and its Impact on Live Stock Marketing. *Austin Virol. Retro Virol.* **3**, 1–8 (2016).

407. Tabassum, S. *et al.* Rift Valley fever virus outbreak in Mauritania yet again in 2022: No room for complacency. *Heal. Sci. Reports* **6**, 1–6 (2023).

408. Chemison, A., Ramstein, G., Jones, A., Morse, A. & Caminade, C. Ability of a dynamical climate sensitive disease model to reproduce historical Rift Valley Fever outbreaks over Africa. *Sci. Rep.* **14**, 1–9 (2024).

409. Cecilia, H. *et al. Mechanistic models of Rift Valley fever virus transmission dynamics: A systematic review*. *medRxiv* (2022). doi:10.1371/journal.pntd.0010339.

410. Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M. & Failloux, A. B. Potential vectors of rift valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **8**, 749–753 (2008).

411. Tran, A. *et al.* A Geographical Information System-Based Multicriteria Evaluation to Map Areas at Risk for Rift Valley Fever Vector-Borne Transmission in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* **60**, 14–23 (2013).

412. Lancelot, R. *et al.* Drivers of Rift Valley fever epidemics in Madagascar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 938–943 (2017).

413. Métras, R. *et al.* Drivers for Rift Valley fever emergence in Mayotte: A Bayesian modelling approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, (2017).

414. Nicholas, D. E., Jacobsen, K. H. & Waters, N. M. Risk factors associated with human Rift Valley fever infection: systematic review and meta-analysis. *Trop. Med. Int. Heal.* **19**, 1420–1429 (2014).

415. Ng'ang'a, C. M., Bukachi, S. A. & Bett, B. K. Lay perceptions of risk factors for Rift Valley fever in a pastoral community in northeastern Kenya. *BMC Public Health* **16**, 1–10 (2016).

416. Connors, K. A. & Hartman, A. L. Advances in Understanding Neuropathogenesis of Rift Valley Fever Virus. *Annu. Rev. Virol.* **9**, 437–450 (2022).

417. Rippy, M. K., Topper, M. J., Mebus, C. A. & Morrill, J. C. Rift Valley Fever Virus-induced Encephalomyelitis and Hepatitis in Calves. *Vet. Pathol.* **29**, 495–502 (1992).

418. Kroeker, A. L. *et al.* RVFV infection in goats by different routes of inoculation. *Viruses* **10**, 1–18 (2018).

419. Kroeker, A. L. *et al.* Increased Susceptibility of Cattle to Intranasal RVFV Infection. *Front. Vet. Sci.* **7**, 1–11 (2020).

420. Odendaal, L., Clift, S. J., Fosgate, G. T. & Davis, A. S. Ovine Fetal and Placental Lesions and Cellular Tropism in Natural Rift Valley Fever Virus Infections. *Vet. Pathol.* **57**, 791–806 (2020).

421. Barbeau, D. J. *et al.* Rift Valley Fever Virus Infection Causes Acute Encephalitis in the Ferret. *mSphere* **5**, (2020).

422. Anderson, G. W., Slone, T. W. & Peters, C. J. The gerbil, Meriones unguiculatus, a model for Rift Valley fever viral encephalitis. *Arch. Virol.* **102**, 187–196 (1988).

423. Anderson, G. W., Slone, T. W. & Peters, C. J. Pathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) in inbred rats. *Microb. Pathog.* **2**, (1987).

424. Bales, J. M., Powell, D. S., Bethel, L. M., Reed, D. S. & Hartman, A. L. Choice of inbred rat strain impacts lethality and disease course after respiratory infection with Rift Valley Fever Virus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 105 (2012).

425. Näslund, J. *et al.* Kinetics of Rift Valley Fever Virus in experimentally infected mice using quantitative real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* **151**, 277–282 (2008).

426. Graham, V. A. *et al.* Pathogenesis of Rift Valley Fever Virus in a BALB/c Mouse Model Is Affected by Virus Culture Conditions and Sex of the Animals. *Viruses* **15**, (2023).

427. Boyles, D. A. *et al.* Development of Rift valley fever encephalitis in rats is mediated by early infection of olfactory epithelium and neuroinvasion across the cribriform plate. *J. Gen. Virol.* **102**, (2021).

428. Connors, K. A., Frey, Z. D., Demers, M. J., Wills, Z. P. & Hartman, A. L. Acute Rift Valley fever virus infection induces inflammatory cytokines and cell death in ex vivo rat brain slice culture. *J. Gen. Virol.* **105**, 1–13 (2024).

429. Dodd, K. A. *et al.* 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 Negl. Trop. Dis.* **8**, (2014).

430. Hum, N. R. *et al.* MAVS mediates a protective immune response in the brain to Rift Valley fever virus. *PLoS Pathog.* **18**, 1–28 (2022).

431. Dodd, K. A., McElroy, A. K., Jones, M. E. B., Nichol, S. T. & Spiropoulou, C. F. Rift Valley Fever Virus Clearance and Protection from Neurologic Disease Are Dependent on CD4 + T Cell and Virus-Specific Antibody Responses . *J. Virol.* **87**, 6161–6171 (2013).

432. Michaely, L. M. *et al.* NSG-Mice Reveal the Importance of a Functional Innate and Adaptive Immune Response to Overcome RVFV Infection. *Viruses* **14**, 1–17 (2022).

433. Harmon, J. R. *et al.* CD4 T Cells, CD8 T Cells, and Monocytes Coordinate To Prevent Rift Valley Fever Virus Encephalitis. *J. Virol.* **92**, (2018).

434. Barbeau, D. J. *et al.* Identification and Characterization of Rift Valley Fever Virus-Specific T Cells Reveals a Dependence on CD40/CD40L Interactions for Prevention of Encephalitis. *J. Virol.* **95**, 1–13 (2021).

435. Weilhammer, D. R. Investigating the role of innate immunity in viral encephalitis caused

by Rift Valley fever virus. (2019) doi:10.2172/1573140.

436. Caroline, A. L., Kujawa, M. R., Oury, T. D., Reed, D. S. & Hartman, A. L. Inflammatory biomarkers associated with lethal rift valley fever encephalitis in the lewis rat model. *Front. Microbiol.* **6**, 1–15 (2016).

437. Smith, D. R. *et al.* Development of a Novel Nonhuman Primate Model for Rift Valley Fever. *J. Virol.* **86**, 2109–2120 (2012).

438. Morrill, J. C. *et al.* Pathogenesis of Rift Valley fever in rhesus monkeys: role of interferon response. *Arch. Virol.* **110**, 195–212 (1990).

439. Ermler, M. E. *et al.* RNA Helicase Signaling Is Critical for Type I Interferon Production and Protection against Rift Valley Fever Virus during Mucosal Challenge. *J. Virol.* **87**, 4846–4860 (2013).

440. Moy, R. H. *et al.* Antiviral autophagy restricts rift valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* **40**, 51–65 (2014).

441. Griesman, T. *et al.* The lipopeptide Pam3CSK4 inhibits Rift Valley fever virus infection and protects from encephalitis. *PLoS Pathog.* **20**, 1–29 (2024).

442. Sandrock, M., Frese, M., Haller, O. & Kochs, G. Interferon-Induced Rat Mx Proteins Confer Resistance to Rift Valley Fever Virus and Other Arthropod-Borne Viruses. *J. Interf. Cytokine Res.* **21**, 663–668 (2001).

443. Alem, F. *et al.* Exosomes originating from infection with the cytoplasmic single-stranded RNA virus Rift Valley fever virus (RVFV) protect recipient cells by inducing RIG-I mediated IFN-B response that leads to activation of autophagy. *Cell Biosci.* **11**, 220 (2021).

444. Wu, J., Mao, K., Zhang, R. & Fu, Y. Extracellular vesicles in the pathogenesis of neurotropic viruses. *Microb. Pathog.* **195**, 106901 (2024).

445. Tercero, B., Terasaki, K., Narayanan, K. & Makino, S. Mechanistic insight into the efficient packaging of antigenomic S RNA into Rift Valley fever virus particles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, 1–12 (2023).

446. Ikegami, T., Won, S., Peters, C. J. & Makino, S. Rift Valley Fever Virus NSs mRNA Is Transcribed from an Incoming Anti-Viral-Sense S RNA Segment. *J. Virol.* **79**, 12106–12111 (2005).

447. Léger, P. *et al.* NSs amyloid formation is associated with the virulence of Rift Valley fever virus in mice. *Nat. Commun.* **11**, 3281 (2020).

448. Léger, P. & Lozach, P. Y. Rift Valley fever virus and the amazing NSs protein. *Medecine/Sciences* **37**, 601–608 (2021).

449. Benferhat, R. *et al.* Large-Scale Chromatin Immunoprecipitation with Promoter Sequence Microarray Analysis of the Interaction of the NSs Protein of Rift Valley Fever Virus with Regulatory DNA Regions of the Host Genome. *J. Virol.* **86**, 11333–11344 (2012).

450. Kainulainen, M., Lau, S., Samuel, C. E., Hornung, V. & Weber, F. NSs Virulence Factor of Rift Valley Fever Virus Engages the F-Box Proteins FBXW11 and \textgreek{b}-TRCP1 To Degrade the Antiviral Protein Kinase PKR. *J. Virol.* **90**, 6140–6147 (2016).

451. Petraccione, K. *et al. An LIR motif in the Rift Valley fever virus NSs protein is critical for the interaction with LC3 family members and inhibition of autophagy*. *PLoS Pathogens* vol. 20 (2024).

452. Le May, N. *et al.* TFIIH Transcription Factor, a Target for the Rift Valley Hemorrhagic Fever Virus viremia, and leads to miscarriage in pregnant animals, resulting in economic disaster in African countries. RVFV possesses a single-stranded segmented RNA genome. *Cell* **116**, 541–550 (2004).

453. Kainulainen, M. *et al.* Virulence factor NSs of rift valley fever virus recruits the F-box protein FBXO3 to degrade subunit p62 of general transcription factor TFIIH. *J. Virol.* **88**, 3464–3473 (2014).

454. Bermúdez-Méndez, E. *et al.* Transcriptomic Profiling Reveals Intense Host-Pathogen Dispute Compromising Homeostasis during Acute Rift Valley Fever Virus Infection. *J. Virol.* **97**, (2023).

455. Copeland, A. M., van Deusen, N. M. & Schmaljohn, C. S. Rift Valley fever virus NSS gene expression correlates with a defect in nuclear mRNA export. *Virology* **486**, 88–93 (2015).

456. Baer, A. *et al.* Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication. *J. Biol. Chem.* **287**, 7399–7410 (2012).

457. Mansuroglu, Z. *et al.* Nonstructural NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Interacts with Pericentromeric DNA Sequences of the Host Cell, Inducing Chromosome Cohesion and Segregation Defects. *J. Virol.* **84**, 928–939 (2010).

458. Bamia, A. *et al.* The NSs Protein Encoded by the Virulent Strain of Rift Valley Fever Virus Targets the Expression of Abl2 and the Actin Cytoskeleton of the Host, Affecting Cell Mobility, Cell Shape, and Cell-Cell Adhesion. *J. Virol.* **95**, (2020).

459. Lacote, S. *et al.* Intranasal Exposure to Rift Valley Fever Virus Live-Attenuated Strains Leads to High Mortality Rate in Immunocompetent Mice. *Viruses* **14**, 2470 (2022).

460. Michaely, L. M. *et al.* Intact Type I Interferon Receptor Signaling Prevents Hepatocellular Necrosis but Not Encephalitis in a Dose-Dependent Manner in Rift Valley Fever Virus Infected Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12492 (2022).

461. D. J. van Velden, J. Meyer, J. Olivier, J. Gear & B. Mcintosh. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. *undefined* (1977).

462. Anywaine, Z., Lule, S. A., Hansen, C., Warimwe, G. & Elliott, A. Clinical manifestations of Rift Valley fever in humans: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **16**, e0010233 (2022).

463. Laughlin, L. W., Meegan, J. M., Strausbaugh, L. J., Moren, D. M. & Watten, R. H. Epidemic rift valley fever in Egypt: Observations of the spectrum of human illness. in *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 73 630–633 (Trans R Soc Trop Med Hyg, 1979).

464. Laughlin, L. W. *et al.* Clinical studies on Rift Valley fever. Part 2: Ophthalmologic and central nervous system complications. *J. Egypt. Public Health Assoc.* **53**, 183–4 (1978).

465. McIntosh, B. M., Russell, D., Dos Santos, I. & Gear, J. H. S. Rift Valley fever in humans

in South Africa. *South African Med. J.* **58**, 803–806 (1980).

466. Alrajhi, A. A., Al-Semari, A. & Al-Watban, J. Rift Valley Fever Encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 554–555 (2004).

467. Riou, O. *et al.* Neurologic and neurosensory forms of Rift Valley fever in Mauritania. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **82**, 605 (1989).

468. Maar, S. A., Swanepoel, R. & Gelfand, M. Rift Valley fever encephalitis. A description of a case. *Cent. Afr. J. Med.* **25**, 8–11 (1979).

469. El-Din Abdel-Wahab, K. S. *et al.* Rift Valley Fever virus infections in Egypt: pathological and virological findings in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 392–396 (1978).

470. World Health Organization. RIFT VALLEY FEVER= FIÈVRE DE LA VALLÉE DU RIFT. *Wkly. Epidemiol. Rec. Relev. épidémiologique Hebd.* **63**, 52–53 (1988).

471. Potokar, M., Zorec, R. & Jorgačevski, J. Astrocytes Are a Key Target for Neurotropic Viral Infection. *Cells* **12**, 1–19 (2023).

472. Deligne, C. *et al.* Development of a human in vitro blood-brain tumor barrier model of diffuse intrinsic pontine glioma to better understand the chemoresistance. *Fluids Barriers CNS* **17**, 1–15 (2020).

473. Dehouck, M. -P, Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. -C & Cecchelli, R. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood–Brain Barrier In Vitro. *J. Neurochem.* **54**, 1798–1801 (1990).

474. Dehouck, M. -P *et al.* Drug Transfer Across the Blood-Brain Barrier: Correlation Between In Vitro and In Vivo Models. *J. Neurochem.* **58**, 1790–1797 (1992).

475. Dehouck, M.-P. *et al.* Quantitative Targeted Absolute Proteomics for Better Characterization of an In Vitro Human Blood–Brain Barrier Model Derived from Hematopoietic Stem Cells. *Cells* **11**, 3963 (2022).

476. Cecchelli, R. *et al.* A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* **9**, (2014).

477. Zhou, J. *et al.* Astrocytic LRP1 enables mitochondria transfer to neurons and mitigates brain ischemic stroke by suppressing ARF1 lactylation. *Cell Metab.* (2024) doi:10.1016/j.cmet.2024.05.016.

478. Romeo, R., Boden-El Mourabit, D., Scheller, A., Mark, M. D. & Faissner, A. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) as a Novel Regulator of Early Astroglial Differentiation. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, (2021).

479. Švajger, U., Anderluh, M., Jeras, M. & Obermajer, N. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell. Signal.* **22**, 1397–1405 (2010).

480. Schneider, W. J. Lipoprotein Receptors. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (eds. Ridgway, N. D. & McLeod, R. S.) 489–518 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-444-63438-2.00017-1.

481. Quellec, J. *et al.* Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes. *Emerg. Microbes Infect.* **12**, (2023).

482. Lodge, R. *et al.* HIV-1 Promotes Intake of Leishmania Parasites by Enhancing Phosphatidylserine-Mediated, CD91/LRP-1-Dependent Phagocytosis in Human Macrophages. *PLoS One* **7**, e32761 (2012).

483. Salinas, S. *et al.* Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005913 (2017).

484. Tassaneetrithep, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**, 823–829 (2003).

485. Muffat, J. *et al.* Human induced pluripotent stem cell-derived glial cells and neural progenitors display divergent responses to Zika and dengue infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 7117–7122 (2018).

486. Hulswit, R. J. G., Paesen, G. C., Bowden, T. A. & Shi, X. Recent Advances in Bunyavirus Glycoprotein Research: Precursor Processing, Receptor Binding and Structure. *Viruses* **13**, 353 (2021).

487. Sagar, D. *et al.* Dendritic cell CNS recruitment correlates with disease severity in EAE via CCL2 chemotaxis at the blood–brain barrier through paracellular transmigration and ERK activation. *J. Neuroinflammation* **9**, 245 (2012).

488. Meager, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**, 27–39 (1999).

489. Takeshita, Y. & Ransohoff, R. M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: Chemokine regulation and in vitro models. *Immunol. Rev.* **248**, 228–239 (2012).

490. Vafadari, B., Salamian, A. & Kaczmarek, L. <scp>MMP</scp> -9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. *J. Neurochem.* **139**, 91–114 (2016).

491. Harkness, K. A. Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium. *Brain* **123**, 698–709 (2000).

492. Cross, A. K. & Woodroofe, M. N. Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* **28**, 183–189 (1999).

493. Roe, K. *et al.* West Nile virus-induced disruption of the blood–brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J. Gen. Virol.* **93**, 1193–1203 (2012).

494. Wang, P. *et al.* Matrix Metalloproteinase 9 Facilitates West Nile Virus Entry into the Brain. *J. Virol.* **82**, 8978–8985 (2008).

495. Varadarajan, S., Stephenson, R. E. & Miller, A. L. Multiscale dynamics of tight junction remodeling. *J. Cell Sci.* **132**, (2019).

496. Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* **11**, 1847–1857 (2001).

497. Higashi, T., Saito, A. C. & Chiba, H. Damage control of epithelial barrier function in dynamic environments. *Eur. J. Cell Biol.* **103**, 151410 (2024).

498. Ravid, O. *et al.* Blood-Brain Barrier Cellular Responses Toward Organophosphates:

Natural Compensatory Processes and Exogenous Interventions to Rescue Barrier Properties. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, (2018).

499. Dahm, T., Rudolph, H., Schwerk, C., Schroten, H. & Tenenbaum, T. Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. *Mediators Inflamm.* **2016**, (2016).

500. Page, A. V & Liles, W. C. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence* **4**, 507–516 (2013).

501. McElroy, A. K. *et al.* Ebola Hemorrhagic Fever: Novel Biomarker Correlates of Clinical Outcome. *J. Infect. Dis.* **210**, 558–566 (2014).

502. Rossler, K., Neuchrist, C., Kitz, K., Kraft, D. & Lassmann, H. Expression of Leucocyte Adhesion Molecules at the Human Blood-Brain Barrier (BBB). **374**, (1992).

503. Zhang, Y. G. *et al.* Type I/type III IFN and related factors regulate JEV infection and BBB endothelial integrity. *J. Neuroinflammation* **20**, 1–19 (2023).

504. Brown, L. S. *et al.* Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–9 (2019).

505. Bird, B. H., Albariño, C. G. & Nichol, S. T. 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**, 10–15 (2007).

506. Won, S., Ikegami, T., Peters, C. J. & Makino, S. NSm and 78-Kilodalton Proteins of Rift Valley Fever Virus Are Nonessential for Viral Replication in Cell Culture. *J. Virol.* **80**, 8274–8278 (2006).

507. Chen, H. *et al.* Attenuation of neurovirulence of chikungunya virus by a single amino acid mutation in viral E2 envelope protein. *J. Biomed. Sci.* **31**, 8 (2024).

508. Chabert, M. *et al.* Comparative study of two Rift Valley fever virus field strains circulating in Mauritania in 2010 and 2013 reveals the high virulence of the MRU25010-30 strain isolated from camel. *bioRxiv* 2024.04.03.587352 (2024) doi:10.1101/2024.04.03.587352.

509. Haqqani, A. S., Hill, J. J., Mullen, J. & Stanimirovic, D. B. The Blood-Brain and Other Neural Barriers. in *Methods in Molecular Biology* vol. 686 337–353 (2011).

510. Spindler, K. R. & Hsu, T. H. Viral disruption of the blood-brain barrier. *Trends Microbiol.* **20**, 282–290 (2012).

511. Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).

512. Versele, R. *et al.* Ketone Bodies Promote Amyloid-β1–40 Clearance in a Human in Vitro Blood–Brain Barrier Model. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 934 (2020).

513. Storck, S. E., Kurtyka, M. & Pietrzik, C. U. Brain endothelial LRP1 maintains blood–brain barrier integrity. *Fluids Barriers CNS* **18**, 27 (2021).

514. Mao, H. *et al.* Endothelial LRP1 regulates metabolic responses by acting as a co-activator of PPARγ. *Nat. Commun.* **8**, 14960 (2017).

515. Ubogu, E. E. Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. *Exp.*

Neurol. **328**, 113272 (2020).

516. Blackmon, A. M. *et al.* Varicella Zoster Virus Alters Expression of Cell Adhesion Proteins in Human Perineurial Cells via Interleukin 6. *J. Infect. Dis.* **220**, 1453–1461 (2019).

517. Yosef, N., Xia, R. H. & Ubogu, E. E. Development and Characterization of a Novel Human In Vitro Blood-Nerve Barrier Model Using Primary Endoneurial Endothelial Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 82–97 (2010).

518. Malheiro, A., Wieringa, P. & Moroni, L. Peripheral neurovascular link: an overview of interactions and in vitro models. *Trends Endocrinol. Metab.* **32**, 623–638 (2021).

519. Takeshita, Y., Sato, R. & Kanda, T. Blood–Nerve Barrier (BNB) Pathology in Diabetic Peripheral Neuropathy and In Vitro Human BNB Model. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 62 (2020).

520. Yuan, Q., Li, J.-J., An, C.-H. & Sun, L. Biological characteristics of rat dorsal root ganglion cell and human vascular endothelial cell in mono- and co-culture. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 6949–6956 (2014).

521. Hackel, D. *et al.* Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, (2012).

522. Yang, S. *et al.* Analgesic drug delivery via recombinant tissue plasminogen activator and microRNA-183-triggered opening of the blood-nerve barrier. *Biomaterials* **82**, 20–33 (2016).

523. Haverty, R. *et al.* SARS-CoV-2 infects neurons, astrocytes, choroid plexus epithelial cells and pericytes of the human central nervous system in vitro. *J. Gen. Virol.* **105**, (2024).

524. Schwerk, C., Tenenbaum, T., Kim, K. S. & Schroten, H. The choroid plexus, a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).

525. Kaur, C., Rathnasamy, G. & Ling, E.-A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **75**, 198–213 (2016).

526. Praetorius, J. & Damkier, H. H. Transport across the choroid plexus epithelium. *Am. J. Physiol. Physiol.* **312**, C673–C686 (2017).

527. Dabbagh, F., Schroten, H. & Schwerk, C. In Vitro Models of the Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier and Their Applications in the Development and Research of (Neuro)Pharmaceuticals. *Pharmaceutics* **14**, 1729 (2022).

528. Mao, H., Lockyer, P., Townley-Tilson, W. H. D., Xie, L. & Pi, X. LRP1 Regulates Retinal Angiogenesis by Inhibiting PARP-1 Activity and Endothelial Cell Proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 350–360 (2016).

529. Hollborn, M. *et al.* Expression of LRP1 in retinal pigment epithelial cells and its regulation by growth factors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 2033–8 (2004).

530. Singh, P. K. *et al.* Zika virus infects cells lining the blood-retinal barrier and causes chorioretinal atrophy in mouse eyes. *JCI Insight* **2**, (2017).

531. Monu, M., Ahmad, F., Olson, R. M., Balendiran, V. & Singh, P. K. SARS-CoV-2 infects cells lining the blood-retinal barrier and induces a hyperinflammatory immune response in the retina via systemic exposure. *PLOS Pathog.* **20**, e1012156 (2024).

532. ter Horst, S. *et al.* The dissemination of Rift Valley fever virus to the eye and sensory neurons of zebrafish larvae is stat1 dependent. *bioRxiv* 2022.08.10.503461 (2022) doi:10.1101/2022.08.10.503461.

533. Schwarz, M. M. *et al.* Rift Valley Fever Virus Infects the Posterior Segment of the Eye and Induces Inflammation in a Rat Model of Ocular Disease. *J. Virol.* **96**, e0111222 (2022).

534. Papa, M. P. *et al.* Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front. Microbiol.* **8**, (2017).

535. Hasebe, R. *et al.* Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.* **10**, 165 (2010).

536. Worku, D. A. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology. *J. Clin. Med.* **12**, 6859 (2023).

537. Velay, A. *et al.* Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 472–493 (2019).

538. Smith, G. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 153–176 (2012).

539. Taylor, M. P. & Enquist, L. W. Axonal spread of neuroinvasive viral infections. *Trends Microbiol.* **23**, 283–288 (2015).

540. Chotiwan, N. *et al.* Type I interferon shapes brain distribution and tropism of tick-borne flavivirus. *Nat. Commun.* **14**, (2023).

541. Rosendal, E., Lindqvist, R., Chotiwan, N., Henriksson, J. & Överby, A. K. Transcriptional Response to Tick-Borne Flavivirus Infection in Neurons, Astrocytes and Microglia In Vivo and In Vitro. *Viruses* **16**, 1327 (2024).

542. Auderset, L., Cullen, C. L. & Young, K. M. Low density lipoprotein-receptor related protein 1 is differentially expressed by neuronal and glial populations in the developing and mature mouse central nervous system. *PLoS One* **11**, 1–22 (2016).

543. Nowakowski, T. J. *et al.* Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* **18**, 591–596 (2016).

544. Bhattacharyya, S. *et al.* Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe* **14**, 136–147 (2013).

545. Zhu, C., Wei, Y. & Wei, X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol. Cancer* **18**, 153 (2019).

546. Xie, S., Zhang, H., Liang, Z., Yang, X. & Cao, R. AXL, an Important Host Factor for DENV and ZIKV Replication. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, (2021).

547. Shimojima, M., Ikeda, Y. & Kawaoka, Y. The Mechanism of Axl-Mediated Ebola Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **196**, S259–S263 (2007).

548. Wang, S. *et al.* AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* **31**, 126–140 (2021).

549. Chen, J. *et al.* AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat. Microbiol.* **3**, 302–309 (2018).

550. Lee, I. *et al.* Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions. *Viruses* **10**, 233 (2018).

551. Fedeli, C. *et al.* Axl Can Serve as Entry Factor for Lassa Virus Depending on the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *J. Virol.* **92**, (2018).

552. Simonin, Y. *et al.* Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* **12**, 161–169 (2016).

553. Villalón-Letelier, F., Brooks, A., Saunders, P., Londrigan, S. & Reading, P. Host Cell Restriction Factors that Limit Influenza A Infection. *Viruses* **9**, 376 (2017).

554. Nagy, P. D. & Pogany, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 137–149 (2012).

555. Head, J. A., Kalveram, B. & Ikegami, T. Functional Analysis of Rift Valley Fever Virus NSs Encoding a Partial Truncation. *PLoS One* **7**, (2012).

556. Cyr, N. *et al.* A ΩXaV motif in the Rift Valley fever virus NSs protein is essential for degrading p62, forming nuclear filaments and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6021–6026 (2015).

557. Olofsson, S., Bally, M., Trybala, E. & Bergström, T. Structure and Role of O-Linked Glycans in Viral Envelope Proteins. *Annu. Rev. Virol.* **10**, 283–304 (2023).

558. Bagdonaite, I. *et al.* Glycoengineered keratinocyte library reveals essential functions of specific glycans for all stages of HSV-1 infection. *Nat. Commun.* **14**, 7000 (2023).

559. Davey, N. E. *et al.* Attributes of short linear motifs. *Mol. BioSyst.* **8**, 268–281 (2012).

560. Veinstein, M., Stroobant, V., Michiels, T. & Sorgeloos, F. The “DDVF” motif used by viral and bacterial proteins to hijack RSK kinases evolved as a mimic of a short linear motif (SLiM) found in proteins related to the RAS-ERK MAP kinase pathway. *bioRxiv* 2024.08.08.607128 (2024) doi:10.1101/2024.08.08.607128.

561. Sorgeloos, F. *et al.* A case of convergent evolution: Several viral and bacterial pathogens hijack RSK kinases through a common linear motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **119**, (2022).

562. Hagai, T., Azia, A., Babu, M. M. & Andino, R. Use of Host-like Peptide Motifs in Viral Proteins Is a Prevalent Strategy in Host-Virus Interactions. *Cell Rep.* **7**, 1729–1739 (2014).

563. Kumar, M. *et al.* The Eukaryotic Linear Motif resource: 2022 release. *Nucleic Acids Res.* **50**, D497–D508 (2022).

564. Dong, X. *et al.* Structural basis for leucine-rich nuclear export signal recognition by CRM1. *Nature* **458**, 1136–1141 (2009).

565. Watanabe, M., Fukuda, M., Yoshida, M., Yanagida, M. & Nishida, E. Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes to Cells* **4**, 291–297 (1999).

566. Azmi, A. S., Uddin, M. H. & Mohammad, R. M. The nuclear export protein XPO1 — from biology to targeted therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**, 152–169 (2021).

567. Stewart, M. Polyadenylation and nuclear export of mRNAs. *J. Biol. Chem.* **294**, 2977–2987 (2019).

568. Khan, M., Hou, S., Chen, M. & Lei, H. Mechanisms of RNA export and nuclear retention. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **14**, 1–20 (2023).

569. Michaely, L. M. *et al.* Rift Valley Fever Virus Non-Structural Protein S Is Associated with Nuclear Translocation of Active Caspase-3 and Inclusion Body Formation. 1–13 (2022).

570. Guan, Z. *et al.* RVFV virulence factor NSs triggers the mitochondrial MCL-1-BAK axis to activate pathogenic NLRP3 pyroptosis. *PLOS Pathog.* **20**, e1012387 (2024).

571. Wei, B. *et al.* <scp>NLRP3</scp> Inflammasome Activation Mediates Hepatitis E Virus-Induced Neuroinflammation. *J. Viral Hepat.* (2024) doi:10.1111/jvh.13998.

572. Hayashi, M., Schultz, E. P., Lanchy, J.-M. M. & Lodmell, J. S. Time-Resolved Analysis of N-RNA Interactions during RVFV Infection Shows Qualitative and Quantitative Shifts in RNA Encapsidation and Packaging. *Viruses* **13**, (2021).

573. Bente, D. A. California Encephalitis, Hantavirus Pulmonary Syndrome, and Bunyavirus Hemorrhagic Fevers. in *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 2025-2030.e1 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00168-5.

574. Zorec, R., Županc, T. A. & Verkhratsky, A. Astrogliopathology in the infectious insults of the brain. *Neurosci. Lett.* **689**, 56–62 (2019).

575. Palus, M. *et al.* Infection and injury of human astrocytes by tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* **95**, 2411–2426 (2014).

576. Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. R. The immune response against flaviviruses. *Nat. Immunol.* **19**, 1189–1198 (2018).

577. Barré-Sinoussi, F. & Montagutelli, X. Animal Models are Essential to Biological Research: Issues and Perspectives. *Futur. Sci. OA* **1**, (2015).

578. Yang, Z. & Xiong, H.-R. In vitro, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages. in *Biomedical Tissue Culture* (InTech, 2012). doi:10.5772/52300.

579. Bi, W., Cai, S., Lei, T. & Wang, L. Implementation of blood-brain barrier on microfluidic chip: Recent advance and future prospects. *Ageing Res. Rev.* **87**, 101921 (2023).

580. Almeida, G. M. *et al.* Neural Infection by Oropouche Virus in Adult Human Brain Slices Induces an Inflammatory and Toxic Response. *Frontiers in Neuroscience* vol. 15 at https://doi.org/10.3389/fnins.2021.674576 (2021).

581. Dionne, K. R. & Tyler, K. L. Slice Culture Modeling of Central Nervous System (CNS) Viral Infection. in 97–117 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-640-5_9.

582. Van Duyne, R. *et al.* Adult Human Brain Tissue Cultures to Study NeuroHIV. *Cells* **13**, 1127 (2024).

583. Bak, A. *et al.* Human organotypic brain slice cultures: a detailed and improved protocol for preparation and long-term maintenance. *J. Neurosci. Methods* **404**, 110055 (2024).

584. Swingler, M., Donadoni, M., Bellizzi, A., Cakir, S. & Sariyer, I. K. iPSC-derived three-dimensional brain organoid models and neurotropic viral infections. *J. Neurovirol.* **29**, 121–134 (2023).

585. Velasco, S., Paulsen, B. & Arlotta, P. 3D Brain Organoids: Studying Brain Development and Disease Outside the Embryo. *Annu. Rev. Neurosci.* **43**, 375–389 (2020).

586. Barreras, P. *et al.* A human-derived 3D brain organoid model to study JC virus infection. *J. Neurovirol.* **28**, 17–26 (2022).

587. Marton, R. M. & Pașca, S. P. Organoid and Assembloid Technologies for Investigating Cellular Crosstalk in Human Brain Development and Disease. *Trends Cell Biol.* **30**, 133–143 (2020).

588. Chiaradia, I. & Lancaster, M. A. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **23**, 1496–1508 (2020).

589. Kakooza-Mwesige, A., Tshala-Katumbay, D. & Juliano, S. L. Viral infections of the central nervous system in Africa. *Brain Res. Bull.* **145**, 2–17 (2019).

590. Archer, B. N. *et al.* Epidemiologic Investigations into Outbreaks of Rift Valley Fever in Humans, South Africa, 2008–2011. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, (2013).

591. Nagata, N. *et al.* The Pathogenesis of 3 Neurotropic Flaviviruses in a Mouse Model Depends on the Route of Neuroinvasion After Viremia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 250–260 (2015).

592. Le Coupanec, A. *et al.* Aedes Mosquito Saliva Modulates Rift Valley Fever Virus Pathogenicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2237 (2013).

593. Connors, K. A., Jr, J. E. C. & Hartman, A. L. Potent neutralizing human monoclonal antibodies protect from inhalational Rift Valley fever virus. (2024).

594. Sissoko, D. *et al.* Rift valley fever, mayotte, 2007-2008. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 568–570 (2009).

595. Juma, J. *et al.* Genomic surveillance of Rift Valley fever virus: from sequencing to lineage assignment. *BMC Genomics* **23**, 1–13 (2022).

596. Onwongá, A. A. *et al.* Genome characterization of Rift Valley fever virus isolated from cattle, goats and sheep during interepidemic periods in Kenya. *BMC Vet. Res.* **20**, 376 (2024).

Annexes

Annexe 1 : Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogénèse

Revue

Virologie

Virologie 2021, 25 (5) : 263-79

Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogenèse

Rift Valley fever virus infection : physiopathology and pathogenesis

Jordan Quellec[1,2]
Sara Salinas[3]
Yannick Simonin[3]
Catherine Cêtre-Sossah[1,2]

[1] Cirad, UMR ASTRE, F-34395 Montpellier, France
[2] Astre, Univ Montpellier, Cirad, Inrae, Montpellier, France
[3] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, MUSE, Inserm, EFS, Montpellier, France

Résumé. La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une arbovirose émergente majeure possédant un cycle de transmission complexe. Le virus de la FVR (RVFV) est transmis aux élevages de ruminants par des moustiques vecteurs, provoquant des épizooties, puis de l'animal à l'Homme, déclenchant alors des épidémies. Au cours de son cycle, le RVFV infecte une large gamme d'hôtes, la pathogenèse associée soulevant de nombreuses questions. Malgré un tropisme principalement hépatique, le RVFV a également un tropisme multicellulaire induisant un effet physiopathologique dans de nombreux tissus. Un tableau clinique commun est habituellement retrouvé (hépatite sévère, hémorragies, leucopénie) mais une variabilité interspécifique a également été décrite. Ainsi, certaines formes sont principalement retrouvées chez l'Homme (atteintes neurologiques et oculaires) ou dans les élevages de ruminants (vagues d'avortements). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués soient encore mal connus, il semblerait que la sévérité de la pathologie soit liée à la réponse inflammatoire précoce. De même, la pathogenèse du RVFV semble être soumise à de nombreux facteurs responsables d'une variabilité inter-individuelle importante dans la sévérité de l'infection. Devant l'absence de traitement spécifique, il semble primordial de mieux comprendre la pathogenèse du RVFV.

Mots-clés : arbovirus, fièvre de la vallée du Rift, physiopathologie, pathogenèse

Abstract. Rift Valley fever (RVF) is a major emerging arboviral disease with a complex epidemiological cycle. RVF virus (RVFV) is transmitted by mosquito vectors to ruminants, causing epizootics, and then from animals to humans, triggering epidemics. During its cycle, RVFV infects a wide range of hosts, but the associated pathogenesis has yet to be elucidated. RVFV displays a predominant hepatic tropism, but also has a multicellular tropism inducing physiopathological effects in several tissues. However, there is variability between species in terms of physiopathology : a common clinical picture is found (severe hepatitis, hemorrhages, leukopenia), but certain forms are mainly found in humans (neurological and ocular damage) or in ruminant herds (waves of abortions). Although the molecular mechanisms involved are still poorly understood, it seems that early inflammatory response is related to the severity of the pathology. A better understanding of the pathogenesis of RVFV seems essential, especially since no specific treatment exists to date.

Keywords: arbovirus, Rift Valley fever, physiopathology, pathogenesis

Introduction

La fièvre de la vallée du Rift (FVR ou Rift Valley fever RVF) est une arbovirose [1, 2] à caractère zoonotique due à un arbovirus (contraction de l'anglais *arthropod-borne-virus*), un virus transmis à l'Homme et/ou aux animaux par la piqûre de vecteurs arthropodes hématophages. Les arbovirus appartiennent à dix familles virales : *Flaviviridae*, *Togaviridae, Asfarviridae, Nairoviridae, Peribunyaviridae, Phenuiviridae, Nyamiviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae* et *Orthomyxoviridae* et sont, pour la plupart d'entre eux, des virus à ARN, excepté le virus de la peste porcine

Correspondance : C. Cêtre-Sossah
<catherine.cetre-sossah@cirad.fr>

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

doi:10.1684/vir.2021.0919

Pour citer cet article : Quellec J, Salinas S, Simonin Y, Cêtre-Sossah C. Infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift : physiopathologie et pathogenèse. *Virologie* 2021; 25(5) : 263-79 doi:10.1684/vir.2021.0919

africaine (PPA) qui est un virus à ADN [1]. Le virus de la FVR (RVFV) appartient au genre *Phlebovirus* de la famille des *Phenuiviridae* et de l'ordre des *Bunyavirales* [2-5]. Les virus du genre *Phlebovirus* sont capables de se répliquer chez les vertébrés et certains vecteurs arthropodes (diptères, tiques) [6]. Au même titre que d'autres arbovirus tels que les virus West Nile ou Zika, le RVFV fait partie des virus émergents et réémergents majeurs de cette dernière décennie, et est responsable de nombreuses épidémies et épizooties principalement sur le continent africain, avec notamment deux épizooties récentes au Kenya et à Madagascar en 2021 [6].

Le RVFV possède une large gamme d'hôtes et est capable d'infecter de nombreuses espèces de ruminants d'élevage (caprine, ovine, bovine, cameline), de faune sauvage ainsi que l'Homme [7, 8]. Les conséquences sanitaires, socio-économiques et alimentaires liées à ces épidémies et/ou épizooties sont directes et indirectes, avec une forte mortalité au sein des élevages de ruminants, une morbidité chez les populations humaines et le développement d'une insécurité alimentaire [9]. À titre d'exemple, l'épizootie de FVR ayant sévi à Mayotte en 2019 est responsable d'une chute de production de lait de 20 % [10]. Du fait de ses conséquences multiples, de sa gravité pour la faune domestique et en santé publique, la FVR fait partie de la liste des pathologies à déclaration obligatoire par l'OIE (Office international des épizooties) [11]. Aucun traitement spécifique n'existe actuellement pour les animaux, mais plusieurs vaccins ont été développés et sont disponibles. Aucun traitement antiviral spécifique ni vaccin n'est autorisé chez l'Homme : à l'heure actuelle, le traitement des infections à RVFV est symptomatique et à visée générale (réhydratation, nutrition) [7, 12]. De ce fait, l'OMS (Organisation mondiale de la santé) a inclus la FVR dans sa liste de pathologies émergentes sévères pouvant engendrer une crise sanitaire et pour laquelle la recherche thérapeutique est urgente [13]. Aussi, la manipulation de ce virus s'effectue en laboratoire de niveau de biosécurité 3. En France, cette manipulation est soumise à une réglementation spécifique régie par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé). Le RVFV fait en effet partie d'une liste de pathogènes qualifiés de MOT (micro-organismes et toxines) définie par le code de la Santé publique (article L. 5139-1).

Malgré les graves conséquences sanitaires liées au RVFV, la pathogenèse résultant de son interaction avec ses différents hôtes est encore, à l'heure actuelle, très peu maîtrisée. Ce manque de connaissances ainsi que l'absence de traitement spécifique ont été à l'origine de cette revue bibliographique.

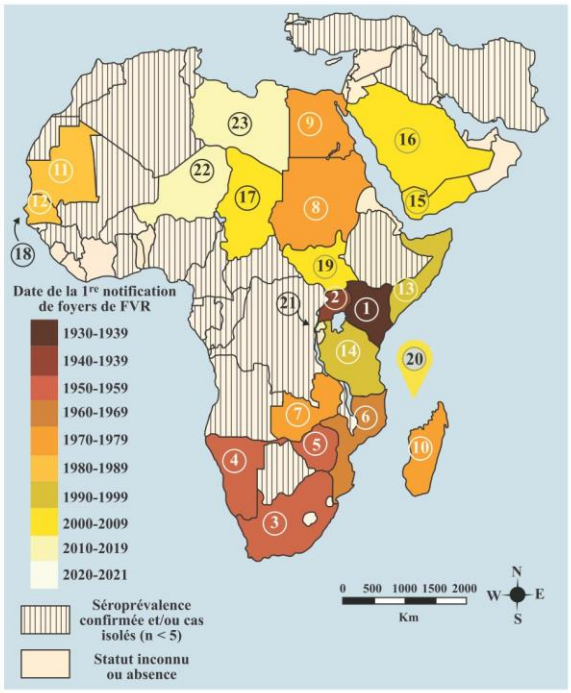
Distribution spatio-temporelle du virus de la FVR

Depuis sa description en 1930 [14], le RVFV a longtemps été considéré comme exclusivement responsable d'épizooties au sein d'élevages de ruminants, telles que celles décrites au Kenya, en Afrique du Sud ou encore en Namibie entre 1931 et 1969 [8, 15]. Cependant, la première épidémie historique touchant la population humaine est apparue en Égypte en 1977, infectant plus de 200 000 personnes et causant *a minima* 600 décès, faisant alors de la FVR une préoccupation sanitaire [15-17]. À ce jour, la FVR a été décrite dans plus de 40 pays en Afrique et au Moyen-Orient et dans différents écosystèmes : des zones arides et irriguées, des forêts humides et des savanes sèches [15] (*figure 1*). Cette extension est liée aux mouvements de populations (humaines et animales), ainsi qu'aux modifications des aires de répartition, de densité et de diversité de la large gamme de vecteurs biologiques compétents pour le RVFV dont au moins sept genres de moustiques (*Aedes, Anopheles, Coquillettidia, Culex, Eretmapodites, Psorophora* et *Mansonia*) [8, 18], ou de vecteurs mécaniques (culicoïdes, glossines, tiques). Ainsi, 23 pays africains ont déclaré une épidémie/épizootie due au RVFV depuis 1930, mais sa circulation, appuyée par différentes enquêtes sérologiques [7 ,8, 15, 17, 19-22] semble avérée dans plus de 40 pays (*figure 1*).

Une émergence virale sur un territoire donné se déroule en trois étapes principales : son introduction, son établissement puis sa propagation. Dans le cas du RVFV, plusieurs facteurs interviennent et jouent un rôle crucial dans le déclenchement des épidémies/épizooties : la diversité et l'abondance des espèces vectrices ainsi que celles de leurs hôtes mammifères (domestiques et sauvages), le niveau d'immunité au regard du RVFV des troupeaux et les conditions environnementales (température, pluviométrie, végétation) [18, 23]. Par exemple, en novembre 2018, une épidémie de FVR a vu le jour à Mayotte, avec au total 142 cas humains confirmés et de très nombreux foyers animaux [10, 24]. Le déclenchement de cette épidémie a été influencé par plusieurs facteurs agissant de façon concomitante : des précipitations importantes majorant le développement des espèces de moustiques compétentes, des mouvements d'animaux (légaux et illégaux) et un niveau d'immunité des troupeaux faible vis-à-vis du RVFV. La présence d'élevages de ruminants vivant à proximité des populations humaines a également favorisé le déclenchement de cette épidémie. Certains pays ayant déclaré des épidémies ou des épizooties de FVR sont désormais considérés comme des régions endémiques (Kenya, Sénégal, Mauritanie). En effet, suite à une première émergence, des réémergences irrégulières mais récurrentes y sont observées.

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.



Référence sur la carte	Pays ayant déclaré une épidémie/épizootie de FVR	Date de 1re notification d'une épidémie/épizootie de FVR	Date des épidémies/épizooties suivantes
①	Kenya	1930	1950-1951, 1968, 1978-1979, 1997-1998, 2006-2007, 2018, 2020-2021
②	Ouganda	1944	1960, 1962, 1968, 2016, 2018
③	Afrique du Sud	1950-1951	1969, 1974-1976, 1981, 1996, 2010, 2009-2011
④	Namibie	1955	1974, 2009-2011
⑤	Zimbabwe	1957-1958	1969-1970, 1979, 1989
⑥	Mozambique	1969	2010, 2014
⑦	Zambie	1973-1974	1978, 1985
⑧	Soudan	1973	2006, 2007-2008, 2010, 2018, 2019-2020
⑨	Égypte	1977	1979, 1993, 2003
⑩	Madagascar	1979	1990, 2007-2008,2009, 2021
⑪	Mauritanie	1987	1993-1994, 1998, 2003, 2010, 2012, 2013-2014, 2015, 2020
⑫	Sénégal	1987	1989, 1993-1994, 1999, 2013-2014
⑬	Somalie	1997	2007
⑭	Tanzanie	1997	2006-2007
⑮	Yémen	2000	2001
⑯	Arabie saoudite	2000	2001
⑰	Tchad	2001	2018
⑱	Gambie	2002	2003, 2017
⑲	Soudan du Sud	2007	
⑳	France (Mayotte)	2007-2008	2018-2019
㉑	Rwanda	2012	2018
㉒	Niger	2016	
㉓	Lybie	2019	

Figure 1. Distribution spatio-temporelle de la FVR entre 1930 et 2021. Le dégradé de couleurs représente les décennies durant lesquelles a été notifiée la première épidémie et/ou épizootie liée à la FVR sur un territoire donné. Les pays hachurés correspondent aux pays sans épidémie/épizootie mais où la circulation virale a été décrite directement ou indirectement par des études sérologiques. Le tableau présente la liste des épidémies/épizooties déclarées en Afrique et au Moyen-Orient [7, 8, 15, 17, 19-22].

revue

Structure et organisation du RVFV

Le RVFV est un virus enveloppé de forme sphérique ayant une taille variant de 90 nm à 110 nm [25, 26] (*figure 2A*). Son génome à ARN simple brin de polarité négative est tripartite, c'est-à-dire divisé en trois segments : un segment L (large) de 6404 nucléotides, un segment M (medium) de 3885 nucléotides et un segment S (small) de 1690 nucléotides. Du fait de la complémentarité des séquences entre les extrémités 5' et 3' de chaque segment, les trois ribonucléoprotéines (RNP) qui composent la particule virale ont une structure tige-boucle pseudo-circulaire [27] (*figure 2A*). Un seul génotype du RVFV est décrit. Il est représenté sous différents clades phylogénétiques structurés en fonction des zones géographiques et des années d'occurrence des épidémies/épizooties. On observe des niveaux de virulence variables en fonction des souches [28, 29]. L'évolution des génomes viraux par réassortiment des segments a été décrite : lors de co-infections d'un hôte par différentes souches de RVFV, des échanges de segments peuvent avoir lieu entre celles-ci lors du cycle de réplication viral [29]. Malgré cette différence de virulence et ce mécanisme de réassortiment, une faible diversité génomique entre les différentes souches (5 % de divergence en identité de séquence nucléotidique et 2 % en acide aminé) est décrite [28-30].

L'enveloppe lipidique du RVFV contient deux glycoprotéines nommées G_N et G_C. Communes à tous les virus de la famille des *Phenuiviridae*, ces glycoprotéines seraient impliquées dans le mécanisme de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale lors de la pénétration du virus par endocytose [30, 31]. Une particularité de cette particule virale est l'absence de capside sous l'enveloppe. En effet, la protection du génome viral est liée à la formation des RNPs : par interaction électrostatique, les nucléoprotéines structurales N se lient directement à chaque segment d'ARN et s'oligomérisent [31]. De même, chaque segment est associé à une ARN polymérase ARN-dépendante nécessaire à la réplication de l'ARN viral et qui est codée par le segment L (polymérase L). Le segment M va permettre la formation d'une polyprotéine, et par un mécanisme de « *leaky-scanning* », ou fuite d'initiation, cette polyprotéine aura une taille variable en fonction du codon *start* utilisé [32]. En effet, ce mécanisme permet de traduire plusieurs cadres de lecture chevauchants de façon indépendante en ignorant un ou plusieurs codons initiateurs de la traduction. Suite à l'action de protéases cellulaires sur les sites de clivage présents sur cette polyprotéine, la traduction du segment M peut conduire à la formation de quatre protéines distinctes : les deux glycoprotéines de surface G_N et G_C et, soit la protéine non structurale NSm, soit la glycoprotéine nommée 78 kDa ou NSm-G_N (*figure 2B*). Le segment S, grâce à son caractère ambisens, code la protéine structurale N et la protéine non structurale NSs. La régulation de la transcription de chacun des brins du segment S (génomique et anti-génomique) est liée à la présence d'une région régulatrice appelée IGR (*intergenic region*). La protéine L est impliquée dans le cycle de réplication (réplication du génome viral, synthèse des ARN antigénomiques permettant la synthèse des protéines virales), la protéine structurale N permet la formation des nouveaux virions, et les deux protéines non structurales NSm (par son activité anti-apoptotique) et NSs (par son activité inhibitrice de la réponse immunitaire) sont décrites pour être deux facteurs de virulence majeurs du RVFV [33, 34].

Cycle de transmission du virus de la FVR

Le cycle de transmission du RVFV fait intervenir différents cycles dépendants de plusieurs facteurs : (i) les conditions environnementales (température, précipitations), (ii) la densité et la diversité des espèces de vecteurs et d'hôtes [18] et (iii) les mouvements de populations d'hôtes (humains et animaux) et des vecteurs (*figure 3*). Le virus est maintenu dans les écosystèmes des régions endémiques à RVFV par un cycle enzootique lors des périodes inter-épidémiques/inter-épizootiques (IEPs). Cependant, les mécanismes de maintien du RVFV sont encore débattus. Une première hypothèse est la transmission verticale du RVFV décrite chez les moustiques du genre *Aedes* ayant un stade larvaire aquatique (*Aedes mcintoshi*, *Aedes vexans*) et capables de transmettre le virus à leur descendance, ce qui maintient le virus au sein des populations de vecteurs entre les épizooties par oviposition (dépôts des œufs dans l'environnement) [35, 36]. Les œufs d'Aedes, très résistants à la dessiccation, sont capables de survivre dans l'environnement pendant plusieurs années (vecteurs dits de maintenance), ce qui expliquerait la maintenance du RVFV dans des territoires arides telles que les savanes sèches [35, 37, 38]. Une seconde hypothèse est envisagée dans les territoires où la faune sauvage est abondante et diversifiée, avec certains hôtes réservoirs non identifiés qui développeraient une virémie suffisamment importante pour permettre une transmission du RVFV [39]. Plusieurs espèces réservoirs ont été proposées : le buffle africain, certaines espèces de chauves-souris [40], ou de rongeurs (*R. rattus*, *A. niloticus*) [39]. De plus, certaines de ces espèces présentent des caractéristiques favorisant la diffusion et la transmission du virus : migration, attitude sociale intraspécifique, proximité de la faune domestique et densité des populations [41-43]. Des modèles prédictifs semblent en faveur d'un équilibre entre ces deux hypothèses, avec notamment le rôle du buffle africain en tant qu'espèce réservoir, piste qui reste à explorer [42, 44].

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

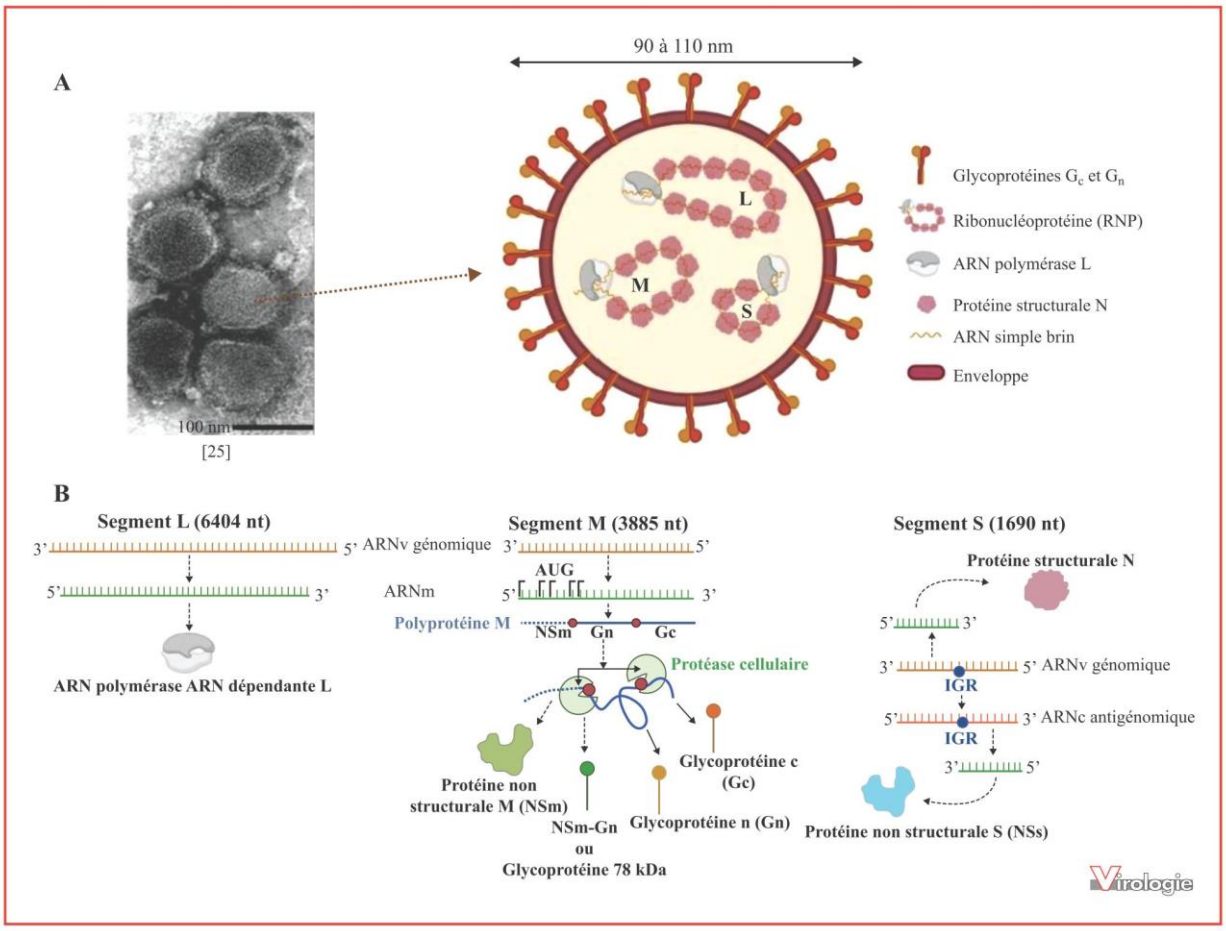


Figure 2. A. Particules virales du RVFV obtenues par microscopie électronique à transmission [25] et son organisation schématique. **B. Représentation schématique de la stratégie d'expression du génome viral**. Les ARNs viraux de polarité négative présents dans la particule virale vont être exprimés différemment en fonction du segment. Le segment L va être transcrit en ARNm (en vert) puis traduit pour permettre la synthèse de la polymérase L. Le segment M va également être transcrit en ARNm, qui possède plusieurs codons *start* (AUG). Par un mécanisme de *leaky-scanning* (saut de codon *start*), la traduction de cet ARNm va permettre la formation de la polyprotéine M de taille variable (variabilité représentée par les pointillés bleus). La présence de sites de clivage (point rouge) sur cette polyprotéine permet, par l'action de protéases cellulaires, de la cliver en plusieurs protéines. Ainsi, en fonction de la protéine M synthétisée et des sites de clivage, il peut y avoir synthèse des protéines de surface Gc et Gn, et soit la glycoprotéine 78 kDa, soit la protéine non structurale M. Le segment S est ambisens : le brin génomique va permettre la formation d'un ARNm permettant la synthèse de la protéine structurale N et le brin antigénomique va permettre la formation lui aussi d'un autre ARNm, qui permettra la synthèse de la protéine non structurale S. La transcription de ces ARNm est régulée par la présence de la région IGR (*intergenic region*, point bleu) qui permet la terminaison de la transcription.

Le déclenchement d'une épizootie dépend de plusieurs facteurs : (i) la multiplication massive du vecteur de maintenance, (ii) l'introduction d'animaux infectés (par voie maritime/terrestre/aérienne), (iii) la présence de vecteurs secondaires et (iv) la densité d'hôtes sensibles à RVFV sur le territoire concerné et leur niveau d'immunité vis-à-vis de RVFV. La modification des conditions climatiques (augmentation importante des précipitations provoquant inondations et crues) favorise une multiplication massive des vecteurs dits de maintenance et la transmission du virus aux élevages de ruminants à proximité [10, 12, 16, 38, 39]. Les hôtes mammifères vont alors développer une virémie importante et suffisante pour infecter d'autres espèces de moustiques ainsi que d'autres espèces d'arthropodes hématophages, alors qualifiés de vecteurs secondaires, qui assurent la transmission horizontale du virus au sein des populations de ruminants domestiques, majorant alors le nombre d'hôtes infectés et devenant à terme les vecteurs

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

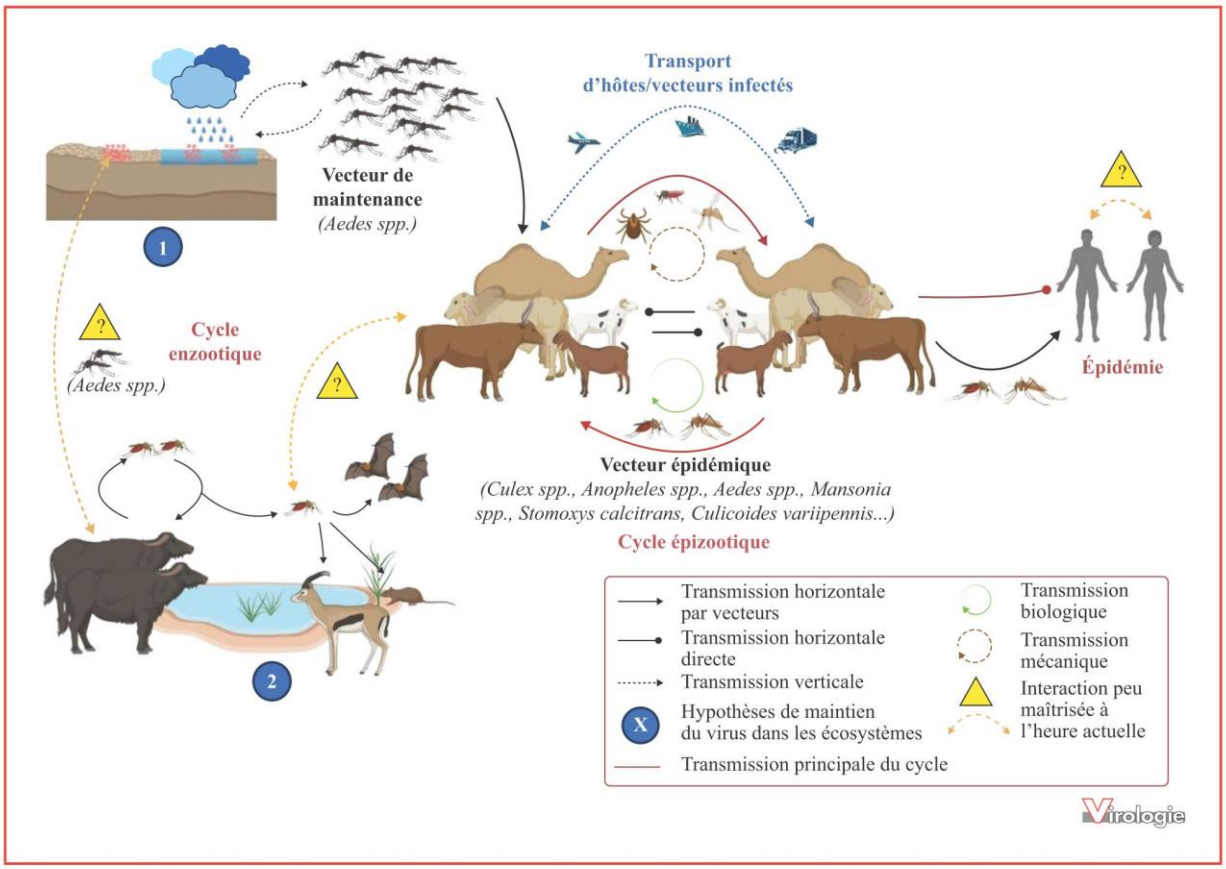


Figure 3. Représentation schématique du cycle de transmission biologique du RVFV. Au sein du cycle enzootique, il existe deux hypothèses du maintien du virus dans l'environnement entre les épidémies : (1) par transmission verticale puis dans l'environnement par oviposition chez certaines espèces de moustiques 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 est d'origine environnementale (prolifération des vecteurs *Aedes*) ou anthropique (mouvements de populations. . .). La transmission du virus au sein des élevages par des vecteurs arthropodes épidémiques permet son amplification 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.

principaux du RVFV à l'origine d'une épizootie [45]. De nombreuses espèces de vecteurs sont impliquées dans ce cycle de transmission du RVFV, qualifié de cycle épizootique avec deux types de vectorisation décrits : la vectorisation biologique et la vectorisation mécanique. La vectorisation biologique correspond à une infection spécifique du vecteur permettant une réplication du virus. La vectorisation mécanique est aspécifique et accidentelle : le virus est transmis horizontalement entre individus par contamination des pièces buccales des arthropodes hématophages lors du repas sanguin sur un individu infecté [2, 36, 46]. Ce type de vectorisation est assuré par de nombreuses espèces d'arthropodes hématophages, mais nécessite une virémie importante chez l'hôte vertébré infecté, une forte densité d'hôtes infectés et la résistance du virion dans l'environnement. Pour les virus capables de vectorisation biologique, la vectorisation mécanique est secondaire et n'est pas indispensable au cycle de transmission biologique [2]. Pour le RVFV, la vectorisation biologique est assurée principalement par les moustiques. En effet, le RVFV a été détecté chez au moins 53 espèces de moustiques [36, 45, 47, 48] avec une compétence vectorielle confirmée chez au moins 47 d'entre elles, représentant sept genres différents de moustiques : *Aedes, Anopheles, Coquillettidia, Culex, Eretmapodites, Psorophora* et *Mansonia*. Néanmoins, la majeure partie des moustiques capables de vectoriser le RVFV est représentée par les genres *Aedes* et *Culex*. Si le rôle des moustiques du genre Aedes semble primordial dans le cycle enzootique, et notamment par leur capacité de transmission

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

verticale, d'autres arthropodes hématophages ont été décrits comme vecteurs mécaniques du RVFV : certaines espèces de phlébotomes, culicoïdes, tiques, stomoxes et glossines [36, 45, 49]. Les deux types de vectorisation jouent donc un rôle dans le déclenchement d'une épizootie/épidémie à RVFV [36, 49] à des niveaux différents. Il est à noter également que la compétence vectorielle est espèce dépendante : par exemple, l'espèce *Culex tarsalis* a un taux de transmission de 52 % alors que l'espèce *Culex pipiens* a un taux de transmission de 8,4 % [48].

La piqûre d'hôtes par des moustiques infectés est la voie principale d'infection des troupeaux de ruminants domestiques, mais certains cas de transmission par contact avec des liquides biologiques infectés (avortons, sang) ont été décrits [12, 45].

Le déclenchement d'une épizootie a été décrit comme pouvant, dans la majorité des cas, être à l'origine d'une épidémie [50]. Plusieurs voies de transmission vers l'Homme sont décrites : (i) majoritairement par contact avec des aérosols de liquides biologiques provenant d'animaux infectés (liquides de sécrétions générées lors des avortements/abattages (fœtus, sang)), et probablement par (ii) voie orale (lait cru) et (iii) piqûre de moustiques [23, 51]. À ce jour, la transmission horizontale interhumaine n'est pas documentée et reste à explorer [50].

Pathogenèse et signes cliniques associés au virus de la FVR

Dans la faune sauvage et chez les vecteurs arthropodes

Les interactions entre le virus, les espèces animales d'hôtes vertébrés (faune domestique et sauvage) et les vecteurs invertébrés compétents pour le RVFV sont en évolution permanente. De nombreuses espèces de mammifères ont déjà été décrites comme susceptibles à une infection par le RVFV, notamment lors des périodes inter-épidémiques, ceci permettant alors d'envisager les hypothèses de maintien du RVFV dans l'environnement dans un cycle sylvatique. Le niveau de séroprévalence prouvant une circulation virale au sein de la faune sauvage est très variable (< 1 % jusque > 80 %) en fonction des espèces testées et de certains paramètres géographiques et environnementaux (proximité d'une zone endémique ou anciennement épidémique, conditions climatiques). Ainsi, la susceptibilité à l'infection par le RVFV a été démontrée chez l'ordre des *Artiodactyla* (mammifères placentaires incluant les ruminants sauvages tels que les antilopes (Gazella, Eudorcas), les buffles d'Afrique (*Syncerus caffer*) et les cerfs de Virginie [39, 52-55]), l'ordre des *Chiroptera* (chauve-souris) [39, 40, 56], l'ordre des *Rodentia* (rats, hamsters, souris) [39], les primates non humains [39], les équidés ou encore certains félidés [39, 52, 53]. Cette longue liste non-exhaustive illustre la large gamme d'hôtes susceptibles à l'infection par le RVFV. Les reptiles, amphibiens et les oiseaux ne semblent, quant à eux, pas être des espèces-hôtes du RVFV [8]. Malgré cet important spectre d'hôtes, la pathogenèse liée au RVFV est peu étudiée au sein de la faune sauvage, où l'infection est considérée comme asymptomatique, notamment chez les chauves-souris, ou peu symptomatique (syndrome fébrile avec faible niveau de mortalité) [40]. Néanmoins, des cas d'avortements ont pu être décrits chez les buffles d'Afrique en phase aiguë de la maladie avec une virémie importante et persistante pendant 48 h à 72 h après infection, et chez deux espèces d'antilopes en captivité : *Antidorcas marsupialis* et *Damaliscus dorcas* [39, 41, 57, 58]. De plus, une mortalité importante a été décrite au sein de la faune sauvage lors de l'épizootie qui a sévi en Afrique du Sud en 2010, ce qui suggère que l'infection n'est pas seulement asymptomatique et souligne ainsi le manque de connaissances de la pathogenèse du RVFV au sein de la faune sauvage [59]. Les seules données disponibles de séroprévalence ne permettent pas d'approfondir la physiopathologie associée au RVFV. De nombreux auteurs s'accordent sur le fait que les interactions virus-hôtes mammifères sauvages sont très mal connues et que la pathogenèse associée reste à explorer [8, 12, 15, 16, 60, 61].

Comme décrit précédemment, les moustiques sont les vecteurs biologiques ayant un rôle central dans les différents cycles de transmission du RVFV et leur infection semble asymptomatique. En effet, il semblerait que, *in vitro*, l'infection des cellules de moustiques par le RVFV n'induise pas d'effet cytopathique, mais les mécanismes d'interactions moléculaires entre le virus et ses vecteurs sont peu décrits [62]. Néanmoins, certaines caractéristiques spécifiques de l'interaction moustique-RVFV ont pu être mises en avant. Premièrement, il a été montré que, *in vitro*, la synthèse de la glycoprotéine 78 kDa semble être induite seulement lors de l'infection de cellules C6/36 (*Aedes albopictus)* et qu'elle jouerait un rôle primordial dans l'interaction du virus avec le moustique et dans sa vectorisation [62]. Deuxièmement, le facteur de virulence NSs est réprimé par ARN interférence chez les cellules de moustiques et ne joue donc pas de rôle inhibiteur de la réponse immunitaire [31]**.** Troisièmement, l'alternance d'hôtes est cruciale pour la stabilité génomique et impacte la virulence grâce à l'acquisition de certains facteurs (N-Glycosylation liée à la maturation de l'enveloppe dans l'appareil de Golgi, nature et composition lipidique de l'enveloppe) mais les mécanismes moléculaires sont très peu décrits [31, 63, 64].

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

Chez les ruminants domestiques

L'épizootie se traduit chez les bovins, caprins, ovins et camélidés par une vague d'avortements, une forte mortalité des jeunes animaux et une mortalité plus modérée des animaux adultes [65]. Ainsi, la susceptibilité et la sévérité de la pathologie liée au RVFV sont variables en fonction de l'âge et de l'espèce de l'individu.

L'espèce ovine est particulièrement sensible à l'infection, avec une mortalité subite chez les adultes allant de 20 à 30 %, chez les jeunes (< 1 mois) de 90 à 100 % et des avortements chez 90-100 % des brebis gestantes [30]. Chez le mouton adulte, les symptômes les plus fréquents sont un comportement apathique, une inappétence, des troubles digestifs (vomissement, diarrhée), des douleurs abdominales, un ictère, une hyperthermie importante (> 40°C), une décharge nasale, une lymphadénomégalie, et des diarrhées hémorragiques (*figure 4*). Une virémie est décelable par une détection génomique du RVFV par technique de RTqPCR et quantifiable par titrage viral dès 36 h après infection après une période d'incubation de 24 h à 48 h et la période symptomatique peut perdurer jusqu'à cinq jours post-infection [65]. La mortalité des adultes est due à trois atteintes principales : une nécrose hépatique multifocale, une atteinte sévère des tubules rénaux et des hémorragies multiples (hépatique, rénale, intestinale) avec une atteinte multi-organes [66]. Une nécrose de la rate associée à une lymphocytose, des lésions pulmonaires et cardiaques, une atteinte des ganglions lymphatiques et une atteinte du tractus intestinal peuvent également être observées. Le foie est décrit comme étant l'organe principal de réplication du RVFV avec la détection d'une forte quantité d'antigènes comparativement aux reins et à la rate [66]. Cependant, la sévérité de la nécrose hépatique et la localisation des foyers de réplication varient en fonction des individus. Malgré un tropisme hépatique majoritaire, de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les neutrophiles, l'épithélium rénal, les cardiomyocytes, l'endothélium vasculaire ou encore les cellules des muscles lisses des vaisseaux sanguins sont infectées, justifiant alors l'atteinte multi-organes observée [66]. Cependant, aucun antigène viral ni de lésions histologiques n'ont été retrouvés dans le système nerveux central (SNC). On retrouve une variabilité de la pathogenèse et de la sévérité de l'infection à RVFV chez le mouton adulte en fonction de l'âge. En effet, les jeunes animaux (< 1 mois) sont très susceptibles à l'infection par le RVFV avec des taux de mortalité de 90 à 100 %. Chez l'agneau, la cinétique d'infection est accélérée par comparaison à l'âge adulte : la période d'incubation est seulement de 12 h à 24 h avec une virémie détectable dès 12 h, la mort survenant entre 24 et 48 h après infection (*figure 4*) [67]. Les signes cliniques observés chez le jeune mouton sont plus sévères que chez l'adulte avec une atteinte majeure du foie et de la rate et une production de particules virales plus intense. Comme chez l'adulte, l'infection des organes lymphoïdes et la lymphocytose associée induit une leucopénie. L'atteinte du foie est liée à une nécrose hépatique diffuse débutant par des foyers de nécrose primaire aléatoire dès 12 h post-infection, associée à des hémorragies hépatiques sévères. Des antigènes viraux sont détectés dans de nombreux tissus et associés à des hémorragies multi-organiques (vaisseaux sanguins associés au système nerveux, aux poumons, aux ganglions lymphatiques). Deux hypothèses peuvent justifier les hémorragies sévères, œdèmes ou ecchymoses retrouvés dans différents organes : (i) l'infection du tissu vasculaire (endothélium vasculaire, cellules du muscle lisse), responsable de sa dégradation et d'une rupture des vaisseaux sanguins, et (ii) l'atteinte hépatique pourrait conduire à des hémorragies, le foie régulant certains facteurs de coagulation. De plus, le RVFV est retrouvé dans de nombreux organes et tissus, ceci pouvant être lié à sa dissémination par voie hématogène lors de la colonisation du compartiment sanguin. Ainsi, il semblerait que certains organes ne soient atteints que par leur compartiment sanguin et que leur parenchyme ne soit pas infecté. Par exemple, on observe des virions dans le compartiment sanguin du système nerveux, mais on ne retrouve pas de particules virales associées directement à celui-ci chez les agneaux [67].

Un autre aspect de la pathogenèse du RVFV peu maîtrisé est le mécanisme responsable des effets cytopathogènes. Pour cela, l'étude histologique des tissus infectés a permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes de mort cellulaire associés à l'infection. En effet, les nécroses observées seraient d'origine lytique, mais également apoptotique (corps apoptotiques, rétrécissement cellulaire, pycnose) accompagné d'un processus inflammatoire avec infiltration de cellules pro-inflammatoires (macrophages et neutrophiles) dans les organes infectés tel que le foie. Ainsi, il est possible que la réplication virale induise des mécanismes de pyroptose et nécroptose, des apoptoses cellulaires immunogènes. La pyroptose est un mécanisme de réponse antivirale primaire résultant de l'activation des récepteurs intracellulaires NLRP3 (NOD-*like receptor family, pyrin domain containing* 3) et lié à la signalétique d'apoptose caspase dépendante. Néanmoins, le RVFV possède un facteur de virulence capable d'inhiber cette voie d'apoptose *via* la protéine NSm qui cible la membrane externe mitochondriale. Cependant, les cellules infectées peuvent alors mettre en place une mort cellulaire programmée autre, la nécroptose, afin de contourner l'action inhibitrice de la protéine NSm [67-70].

Les vagues d'avortements observées dans les troupeaux sont l'un des signes cliniques observés lors d'une épizootie de RVFV. Certains auteurs ont alors étudié les mécanismes

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

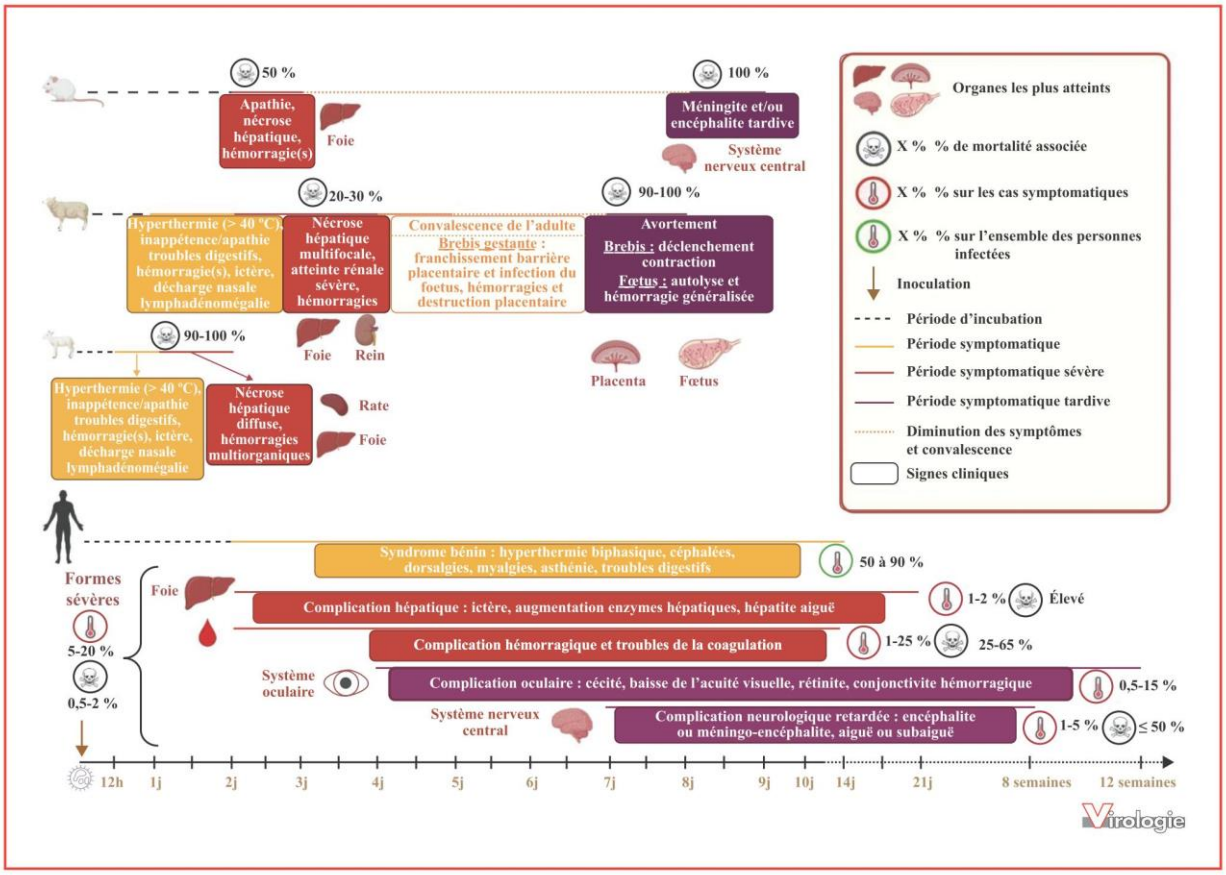


Figure 4. Représentation schématique de la cinétique et de la symptomatologie associées à l'infection par le RVFV en fonction de l'espèce : modèle souris, mouton, agneau, Homme (de haut en bas).
(Réalisé à partir des données de [7, 60, 65-67, 94]).

de physiopathologie associés à l'infection du fœtus et de la brebis gestante [71, 72]. L'infection du fœtus induit son autolyse avec des lésions placentaires de type hémorragique multifocale étendues, et ce, indépendamment du stade de développement. Les antigènes viraux sont présents dans de nombreux organes et tissus du fœtus : foie, rein, organes lymphoïdes, compartiment sanguin, cerveau [71]. Le franchissement de la barrière placentaire induisant le déclenchement des avortements met en avant le rôle du placentome, une zone d'interactions et d'échanges entre les trophoblastes du fœtus et l'épithélium utérin de la mère [72]. Dès le quatrième jour post-infection, des foyers de réplication disséminés sont observés sur le placentome avec une augmentation de la charge virale dans le placenta et les tissus du fœtus. Ainsi, le RVFV est capable d'infecter l'épithélium placentaire pour atteindre les tissus fœtaux. Sept jours post-infection, la destruction de la structure placentaire est effective et aboutit au déclenchement des avortements par diminution importante de la synthèse de progestérone par le placenta, un inhibiteur d'une hormone régulant la contraction utérine et cervicale, la prostaglandine. Ainsi, la destruction de la structure placentaire induit à terme les contractions, et donc l'avortement du fœtus [72].

Chez les espèces caprine, bovine et cameline, la pathogenèse est peu explorée. Néanmoins, il semblerait que les atteintes organiques observées soient très proches de celles observées chez les ovins (avortement, atteinte hépatique sévère conduisant à des hémorragies et une leucopénie), mais avec un taux de mortalité et une sévérité des signes cliniques plus modérée [65]. Chez les caprins, après une période d'incubation de 24 h, la symptomatologie, l'atteinte multi-organes ainsi que les lésions histologiques décrites sont similaires à celles observées chez les ovins. Les caprins sont moins susceptibles au RVFV que les ovins avec notamment une virémie d'une durée plus courte et des titres viraux moins importants [30, 73]. L'infection des chèvres adultes

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

conduit tout de même à une mortalité retardée variant entre 9 et 70 jours après infection (10 %) [64, 74]. La mortalité observée chez les jeunes caprins est similaire à celle retrouvée chez les agneaux (70 à 100 %) et la vague d'avortements lors de l'infection du troupeau atteint également la même sévérité [74]. La réponse immunitaire de la chèvre, suite à l'infection, a été explorée, mettant en évidence une leucopénie observée dans les stades précoces de l'infection (diminution du nombre de lymphocytes T et B). Cependant, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce ainsi qu'une réponse interféron (IFN) de type I, et la production d'anticorps neutralisants à partir de quatre jours post-infection, est généralement décrite comme nécessaire à la survie de l'hôte lors d'une infection par le RVFV [64, 75, 76]. En effet, dans les formes sévères, le RVFV inhibe efficacement la mise en place de cette réponse immunitaire : (i) induction d'une lymphocytose par l'infection des organes lymphoïdes, et (ii) le facteur de virulence NSs du RVFV forme des filaments dans le noyau cellulaire et inhibe l'expression des interférons de type I (IFN-α/β) et de certaines cytokines pro-inflammatoires (*tumor necrosis factor* α (TNFα)) en perturbant la transcription cellulaire (interaction avec le facteur de transcription TFIIH) et la cascade d'activation de l'interféron de type I [34, 77]. Chez les chèvres survivantes à l'infection par le RVFV, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce (Interleukine-12 (IL-12)) et tardive (TNFα, IL6, IL-1β) associée à une réponse interféron de type II (IFNγ) est observée [64]. Cette réponse interféron de type II aurait un rôle indirect sur la réponse antivirale en permettant l'activation des cellules NK (*natural killer*) cytotoxiques. Cette réponse alternative permettrait une résistance à l'infection en contournant l'inhibition de la réponse immunitaire par le RVFV [64].

Les bovins ont une susceptibilité nettement moins marquée à l'infection par le RVFV. De façon générale, les symptômes sont moins sévères et l'hyperthermie ne persiste que quelques jours (un à quatre jours), malgré une virémie détectable dès 24 h post-infection [8]. De même, le taux de mortalité des adultes est évalué à seulement 5-10 % et celui des veaux est plus variable (10-70 % : mortalité plus importante dans les dix premiers jours après la naissance) [30, 65, 78]. Il est possible que des différences dans la réponse immunitaire des bovins face à l'infection du RVFV soient à l'origine de cette sensibilité moindre, mais aucun mécanisme immunitaire permettant de justifier cette variabilité n'a encore été décrit. Dans les formes aiguës, on retrouve un tableau clinique similaire à celui décrit pour les chèvres et les moutons, avec une atteinte pulmonaire supplémentaire se manifestant par une détresse respiratoire [65]. De même, comme chez les autres ruminants, l'infection induit également un niveau élevé d'avortements chez les femelles gestantes (30-40 %) [79, 80].

La perception de l'espèce cameline, initialement décrite comme une espèce peu sensible au RVFV [16, 65], a radicalement changé depuis 2010, où de fortes mortalités ont été observées en Mauritanie chez les adultes et les jeunes animaux avec des formes aiguës similaires à celles retrouvées chez les ovins [81]. La pathogenèse associée au RVFV chez le chameau reste cependant très peu étudiée à l'heure actuelle, malgré l'importance de cette espèce en transhumance dans les territoires endémiques.

Chez l'Homme

Une importante variabilité à la fois dans les formes graves et dans le taux de mortalité est observée au sein des populations humaines dans chaque épidémie. Le taux de mortalité varie entre 0,5 et 2 %, mais peut atteindre des valeurs plus importantes, comme celle de 28 % lors de l'épidémie de Tanzanie en 2007 [82]. L'infection est parfois décrite comme asymptomatique, mais dans la plupart des cas (50 à 90 %), l'apparition d'un syndrome grippal bénin survient après deux à six jours d'incubation et peut durer jusqu'à deux semaines. Ce syndrome grippal se manifeste par des céphalées, myalgies, dorsalgies, une hyperthermie biphasique (48 h d'hyperthermie suivie d'un rebond un à trois jours après) et des troubles digestifs [7] (*figure 4*). Parmi ces cas symptomatiques, il est décrit entre 5 et 20 % de formes graves avec des complications hépatiques, neurologiques, oculaires ou hémorragiques qui sont associées à une mortalité plus élevée [7, 83]. La sévérité des symptômes et de la pathogenèse est corrélée à la charge virale [84, 85]. Comme chez les ruminants, le foie est le principal site de réplication avec un dysfonctionnement hépatique se manifestant alors par un ictère, une augmentation des enzymes hépatiques sanguines et dans les formes graves, par une hépatite aiguë (1 à 2 %) et la présence de nécrose hépatique [50]. Associés à ces troubles hépatiques, on observe également des troubles de la coagulation (coagulopathie intravasculaire diffuse, thrombose, thrombopénie, fibrinolyse) [84] et l'apparition de complications hémorragiques dans 1 à 25 % des cas symptomatiques, avec parfois des thromboses multiples (phlébites, infarctus). Les hémorragies associées au RVFV sont multiples (épitaxie, gingivorragie, hématurie...) et la mortalité associée peut atteindre 65 % [7].

Les atteintes neurologiques, représentant 1 à 5 % des cas symptomatiques, sont une forme de complications retardées : elles apparaissent entre une et quatre semaines après l'infection, et parfois même après 60 jours post-infection. Ces atteintes sont décrites sous deux formes : une forme aiguë et une forme subaiguë. La forme aiguë a une évolution rapide et est la plus mortelle (jusqu'à 50 %), tandis que la forme subaiguë a une évolution plus lente mais induit des séquelles neurologiques parfois définitives, telles qu'une

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

incontinence ou des hémiparésies [60]. Ces formes neurologiques sont dues au déclenchement d'une encéphalite, ou d'une méningo-encéphalite, provoquant des manifestations cliniques multiples telles que des céphalées intenses, un déficit neurologique, une rigidité de la nuque, des hallucinations, des pertes de mémoire, des convulsions ou un coma par exemple [7, 60]. Dans ces formes neurologiques, on observe une augmentation significative des cellules pro-inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes) dans le liquide céphalorachidien et des lésions neurologiques se manifestant par des foyers de nécrose associés à une infiltration leucocytaire importante [86]. Les mécanismes moléculaires de mort cellulaire associés à cette forme grave ne sont pas encore clairement définis : sont-ils liés à la réplication active du virus dans le système nerveux central ou à la réponse inflammatoire associée [12] ? De même, les mécanismes d'invasion du système nerveux central par le RVFV ne sont pas élucidés à l'heure actuelle et différentes hypothèses ont été formulées telle qu'une invasion directe par transport axonal rétrograde ou encore l'utilisation des lymphocytes T $CD4^+$ comme cheval de Troie [12].

Les complications oculaires peuvent être uni ou bilatérales et leur incidence est très variable (0,5 à 15 %) [7]. Elles se manifestent par une diminution de l'acuité visuelle, un scotome, une conjonctivite hémorragique, des douleurs rétro-orbitales, une angiopathie (vasculite, occlusions) et le plus fréquemment observé, une rétinite liée à des lésions nécrotiques du tissu oculaire [60]. Les lésions oculaires actives et aiguës se régénèrent en dix à douze semaines et 40 à 50 % des cas évoluent vers une diminution permanente de l'acuité visuelle dont une grande proportion vers une cécité définitive (71 %) [7]. L'œil est, comme le SNC, un système immuno-privilégié et fortement protégé. Cependant, les mécanismes d'invasion et de mort cellulaire de cet organe ne sont pas encore élucidés [12].

Comme chez les ruminants, le tropisme cellulaire du virus est très large et d'autres organes peuvent être atteints : dysfonctionnement organique multiple, dysfonctionnement rénal (hypovolémie, hyperémie, créatinine élevée), atteintes du tissu cardiaque. Chez l'Homme, l'infection par le RVFV n'a pas encore été décrite comme entraînant une augmentation du risque d'avortements chez les femmes enceintes. Néanmoins, lors de l'épidémie ayant sévi en Arabie saoudite en 2000, la transmission verticale du RVFV de la mère à son fœtus a été suspectée puis démontrée lors de l'épidémie soudanaise de 2007 [87, 88]. La structure anatomique du placenta, différente entre les ruminants d'élevage et les humains, a justifié pendant longtemps un risque amoindri d'avortements. Cependant, il a été montré récemment que les trophoblastes et les cellules placentaires humaines sont permissifs *in vitro* à l'infection par le RVFV [72]. La question suivante reste donc en suspens : le risque amoindri d'avortements chez l'Homme est-il lié à un biais de surveillance épidémiologique ou est-il lié à une différence de susceptibilité entre espèces [12] ?

Tout comme chez les ruminants, on observe également chez l'Homme une variabilité de la physiopathologie et de la sévérité de la FVR. Cette variabilité serait liée à l'action des facteurs de virulence de la souche virale impliquée, telles que les protéines NSm et NSs, ainsi qu'à des facteurs de susceptibilité de l'hôte. Parmi ces facteurs, certains semblent favoriser le développement d'une forme sévère : un mode de vie ou de travail associé aux élevages de ruminants, une co-infection (VIH, hépatite C), une comorbidité (cirrhose), mais également certaines caractéristiques liées à la réponse immunitaire naturelle [12, 51]. En effet, la réponse immunitaire de l'Homme face à l'infection par le RVFV a été, jusqu'à ce jour, peu explorée, et le rôle de l'immunité dans la résistance a parfois entraîné des conclusions contradictoires. Dans un premier temps, plusieurs études décrivent une diminution de la mise en place de la réponse interféron de type I (IFNα et IFNβ) corrélée à une augmentation de la charge virale [77, 84]. Ces études émettent l'hypothèse que la diminution de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-12), ainsi que l'augmentation de la synthèse de cytokines et chimiokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1RA) sont liés à une sévérité accrue de l'infection indiquant que la mise en place de cette réponse inflammatoire précoce est primordiale dans la résistance à l'infection [77]. Ces résultats confirment alors le rôle crucial de la réponse inflammatoire précoce dans la résistance à l'infection. Cependant, d'autres auteurs ont mis en avant une surexpression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, le CXCL9 (Chemokine C-X-C motif ligand 9), le CXCL10, le CCL2 (Chemokine C-C motif ligand 2) et anti-inflammatoire (IL-10) dans des sérums de patients atteints de formes fatales de FVR et ont donc fait l'hypothèse que la sévérité de la pathologie serait liée à une dérégulation de la réponse immunitaire [89]. Ainsi, à l'heure actuelle, la mise en place d'une réponse inflammatoire précoce semble primordiale pour la résistance à l'infection, mais sa dérégulation pourrait être corrélée à une majoration de la sévérité. Ces conclusions illustrent l'importance de la réponse inflammatoire dans la variabilité de la pathogenèse du RVFV, qui reste à investiguer pour comprendre et anticiper les formes graves. Certains auteurs ont même suggéré que certaines de ces cytokines soient utilisées comme marqueurs des formes sévères [89]. Il serait également intéressant de comprendre plus précisément le rôle des facteurs de virulence NSs et NSm dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte et leurs éventuels rôles dans sa dérégulation.

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

La réponse interféron de type I mais également des composants cellulaires de l'immunité naturelle (récepteurs, protéines signalétiques, hélicase cellulaire DDX17) ainsi que la production d'anticorps neutralisants par la mise en place de la réponse adaptative sont essentiels à la résistance à l'infection par le RVFV [64, 75, 76, 90]. Dans ce sens, le rôle du polymorphisme génétique lié à ces fonctions immunitaires dans la variabilité de la virulence a été décrit. En effet, certains auteurs ont décrit que les formes graves associées au RVFV étaient corrélées à un polymorphisme des récepteurs et facteurs signalétiques de l'immunité naturelle (TLR3, TLR7, TLR8, Myd88, TRIF, MAVS et RIG-1), validant alors un rôle génétique et immunitaire dans la résistance à l'infection par le RVFV [91].

Chez les modèles animaux

Dans le but de caractériser plus précisément les mécanismes d'interaction entre virus et hôte, et notamment la pathogenèse induite par cette infection, de nombreux modèles animaux ont été utilisés : certaines espèces de rongeurs (souris, rat, hamster), des primates non-humains ou encore certains ruminants (moutons, agneaux) [60, 70, 92]. Selon le modèle animal utilisé, étant donné le caractère espèce-dépendant de la sensibilité à l'infection par le RVFV, les mécanismes d'infection peuvent différer. Le tropisme hépatique majoritaire avec le développement d'une nécrose hépatique est cependant une caractéristique commune [30, 93]. La voie d'inoculation choisie peut impacter la sévérité de la clinique observée : par injection intradermique ou sous-cutanée (mimant la transmission vectorielle) [64, 73, 78, 94], par piqûre de moustiques [60], injection intrapéritonéale [95] ou encore par aérosol [70, 96, 97]. Par exemple, l'inoculation par voie aérosol (mimant la transmission directe) semble majorer la sévérité en favorisant les formes neurologiques, en facilitant l'invasion du SNC par l'infection du nerf olfactif [96, 98, 99] (*figure 5A*).

La majorité des connaissances associées à la pathogenèse du RVFV sont issues des travaux réalisés sur modèles animaux, et notamment les modèles rongeurs (souris et rat). Trois phases sont rapportées : (i) la phase précoce (< 24 h post-infection), (ii) la phase hépatique (24 h-48 h post-infection) et (iii) la phase tardive (> 48 h post-infection) (*figure 5*) [70, 94, 100].

La phase précoce correspond à la primo invasion des tissus par le virus lors de son entrée. Le virus est confronté aux cellules de la réponse immunitaire naturelle du derme de l'hôte mammifère (infection par piqûre de moustique) ou du tissu pulmonaire (infection par aérosol) : les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que le RVFV est capable d'infecter les macrophages et les DCs, notamment à l'aide des récepteurs DC-SIGN [97, 101]. La permissivité des cellules de l'épiderme, et notamment des kératinocytes, a été montrée chez le mouton mais elle n'a pas été explorée chez d'autres espèces d'hôtes [31, 66, 67]. Probablement corrélée à l'infection des DCs et des macrophages, il y a induction en phase précoce d'une thrombopénie et d'une leucopénie [70, 100, 101]. L'infection de ces cellules est essentielle pour la réplication du virus ainsi que pour sa dissémination chez l'hôte. La protéine virale NSs, ainsi que les propriétés anti-inflammatoires de la salive de moustiques, permettent d'inhiber la mise en place d'une réponse inflammatoire par ces cellules [70]. Grâce à ces premières cellules infectées, le virus va se propager vers les ganglions lymphatiques à travers le système lymphatique pour rejoindre le compartiment sanguin. En se disséminant par cette voie hématogène, de nombreux organes seront atteints : foie, rate, reins et poumons (*figure 5A*). Chez les rongeurs, le RVFV a également un tropisme multicellulaire : cellules épithéliales, neuronales, endocriniennes, hématopoïétiques [94]. En effet, le sulfate d'héparane, exprimé massivement à la surface de nombreux types cellulaires, servirait de facteur d'attachement et faciliterait son entrée [102]. Les récepteurs impliqués ne sont pas encore clairement identifiés.

La phase hépatique correspond à la phase de réplication massive du virus dans les hépatocytes, tropisme majoritaire du RVFV en raison de la présence des récepteurs L-SIGN à leur surface [60, 103]. Dans le modèle murin, à partir de deux jours post-inoculation, une augmentation des enzymes hépatiques sanguines, une augmentation de la bilirubine, une nécrose hépatique et des hémorragies hépatiques et intestinales sont observées. L'infection des hépatocytes induit une déstabilisation de l'architecture du foie et donc une perturbation de sa fonction biologique [94]. Le foie est responsable de la synthèse de certaines protéines de la coagulation. La diminution de cette synthèse induit la formation de caillots sanguins disséminés, qui vont séquestrer les facteurs de coagulation, et induire une perturbation du système de coagulation systémique, se manifestant alors par des hémorragies et thromboses (CIVD : coagulopathie intravasculaire disséminée) [93]. Lors de l'infection des hépatocytes par le RVFV, on observe leur apoptose accompagnée d'une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs pro et anti apoptotiques ainsi qu'une infiltration de neutrophiles dans le foie [104]. La mise en place de cette inflammation pourrait être à l'origine de la nécrose hépatique. Dans les cas graves, l'IL-10, cytokine anti-inflammatoire régulant la réponse inflammatoire mise en place, est fortement exprimée et inhibe la réponse anti-RVFV [89]. La clairance de la phase hépatique est dépendante de la réponse immunitaire adaptative (anticorps neutralisants) et de sa régulation par des cytokines régulatrices (balance IL-10/IL-12). Il semblerait donc qu'il y ait une corrélation importante entre balance

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

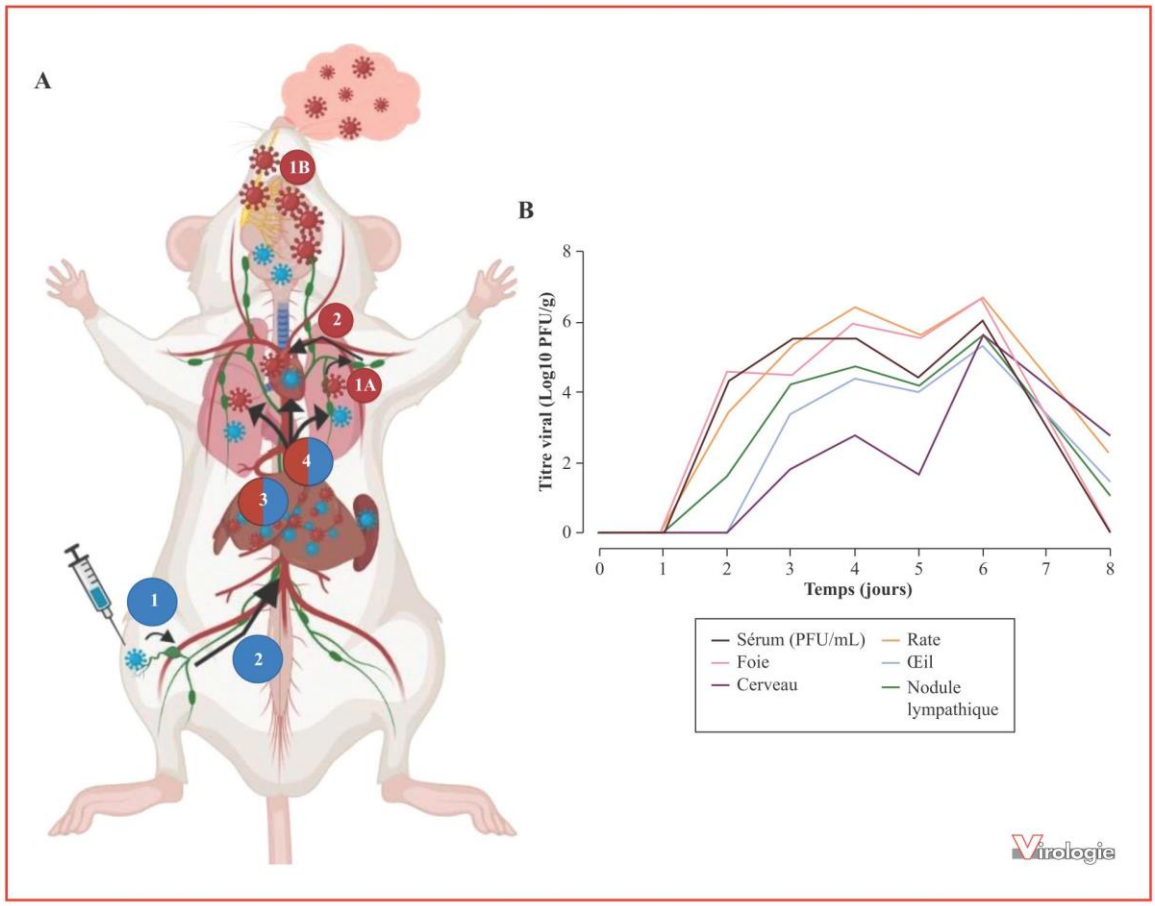


Figure 5. A. Cinétique d'infection du RVFV dans le modèle murin inoculé par voie intradermique (bleu), mimant ainsi l'infection par piqûre du vecteur moustique, ou par aérosol (rouge), mimant la transmission directe. Phase précoce : par voie intradermique, le RVFV infecte les cellules de l'immunité naturelle de la peau (cellules dendritiques, macrophages, . . .) (1) et par aérosols, il infecte les cellules de l'immunité naturelle résidentes du tissu pulmonaire (1A) mais atteint également le système nerveux en infectant le nerf olfactif (1B). Indépendamment de la voie d'exposition, il est ensuite acheminé vers les ganglions lymphatiques qui serviront de site de réplication précoce. Le virus rejoint la circulation sanguine pour atteindre les organes cibles dont le foie (2). Phase hépatique : le foie est le site majeur de réplication, responsable de la production intense de virions, indépendamment de la voie d'exposition (3). Phase tardive : la réplication du RVFV au niveau hépatique augmente la dissémination par voie hématogène du virus vers les tissus secondaires (cerveau, œil, cœur), majorant alors la charge virale et la réplication du virus dans ces tissus (4).
PFU, *particle forming unit*. (Réalisé à partir des données de [70, 94, 98].)
B. Évolution de la charge virale dans les tissus au cours du temps après infection par le RVFV dans le modèle murin. Dans les deux premiers jours post-infection, une colonisation du compartiment sanguin, des organes lymphoïdes et du foie est observée. Elle est ensuite suivie d'une colonisation plus tardive (48-72 h post-infection) dans d'autres organes tels que l'œil et le cerveau avec un pic de réplication au sixième jour post-infection. À partir du huitième jour post-infection, la charge virale détectable dans les organes colonisés tardivement reste plus élevée que celle détectée en phase précoce dans la rate, le foie et le compartiment sanguin jusqu'à une disparition totale du virus dans ces derniers.
(Réalisé à partir des données de [94].)

cytokinique, réponse inflammatoire, réponse adaptative et sévérité de la pathologie. En effet, chez les souris survivantes à la phase hépatique, un pic de réplication virale à six jours post-inoculation est observé puis une diminution progressive de la charge virale jusqu'à un niveau non détectable dans le foie ou le sang (*figure 5B*).

Liée à une majoration de la virémie suite à la réplication hépatique, la phase tardive correspond à l'augmentation retardée de la charge virale associée aux tissus secondaires (cerveau, cœur, pancréas, ovaires) se manifestant donc par des symptômes tardifs. En effet, certains compartiments sont infectés plus tardivement comme le cerveau, trois

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

jours post-inoculation, avec un développement de signes neurologiques plus tardifs (huit jours post-inoculation) (*figure 5B*) [94, 98, 101] engendrant une encéphalite tardive, des hémorragies cérébrales et des paralysies. Néanmoins, les mécanismes d'invasion du SNC ainsi que le neurotropisme du RVFV restent encore à explorer. Le modèle murin, très sensible à l'infection par le RVFV (50 % de mortalité en stade précoce par nécrose hépatique et 100 % en stade tardif par le développement d'une encéphalite), est adapté pour l'étude des formes neurologiques et systémiques. En effet, l'infection du modèle murin reproduit, en partie, ce qui est observé chez l'Homme avec une possible forme neurologique grave à un stade tardif de l'infection et une accumulation des particules virales dans différents compartiments et types cellulaires du cerveau. Ce modèle a permis de mettre en avant l'existence d'une variabilité dans la sévérité de l'infection liée au fond génétique : certains locus ont été associés chez certaines souris à une susceptibilité accrue à l'infection par le RVFV [105].

Un autre modèle très utilisé est le primate non-humain (PNH), comme les macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) ou les macaques crabier (*Macaca fascicularis*) [92]. Ces modèles développent des symptômes proches de ceux retrouvés chez l'Homme (virémie, hyperthermie, leucopénie, nécrose hépatique et hémorragies) et ont une susceptibilité plus proche de celle de l'Homme. En effet, ils sont moins susceptibles que les modèles rongeurs et certaines espèces sont même totalement résistantes à l'infection (*Ateles paniscus*). Les macaques Rhésus ont longtemps été considérés comme le modèle PNH le plus réaliste pour l'étude de la pathologie humaine : 18 % de mortalité avec développement des formes compliquées observées chez l'Homme, hormis les formes oculaires et neurologiques. Ce modèle a permis d'établir le rôle essentiel de la réponse interféron de type I dans l'infection par le RVFV [92]. Cependant, les deux problématiques majeures de ce modèle étaient la nécessité d'une inoculation par voie intraveineuse, ne mimant donc pas les voies naturelles d'exposition (moustiques, aérosol), ainsi qu'un taux de mortalité relativement faible pour les études d'efficacité vaccinale. Deux autres espèces de PNH sont utilisées à ce jour : le grivet (*Chlorocebus aethiops*) [96] et le ouistiti commun (*Callithrix jacchus*) [107]. Il a ainsi été montré que ces deux modèles de PNH sont davantage adaptés à l'étude des formes neurologiques humaines : suite à une exposition par aérosol, la voie de transmission principale à l'Homme, ces deux espèces développent des symptômes sévères et proches du tableau clinique humain, et notamment une encéphalite tardive fatale (huit à dix jours post-infection, 100 % des individus) [96, 107]. Les grivets ont depuis été utilisés comme modèle afin de déterminer les marqueurs inflammatoires sanguins des formes neurologiques sévères. Dans les deux premiers jours post-infection, il a pu être mis en évidence que les PNH survivants à l'infection ont mis en place une réponse inflammatoire précoce (IL-6, IL-8) ainsi qu'une réponse interféron de type I (IFN-α) et II (IFN-γ). Quatre jours post-infection, seuls les PNH survivants ont pu mettre une place une réponse adaptative (prolifération des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$) [106]. Par ces conclusions, les auteurs ont fait l'hypothèse que certains marqueurs immunitaires sanguins pourraient être utilisés comme marqueurs des formes graves, une hypothèse également formulée chez l'Homme [89]. Pour conclure, ces résultats confirment le rôle de la réponse immunitaire précoce dans la résistance à l'infection.

Conclusion

La pathogenèse induite par le RVFV a pu être explorée chez les modèles animaux, notamment les modèles murins et PNH, mais la pathogenèse associée aux ruminants d'élevages et à l'Homme reste peu explorée. Il existe un tableau clinique commun aux différents hôtes, et notamment une leucopénie, une nécrose hépatique sévère et le déclenchement d'hémorragies. Cependant, il semblerait que le déclenchement de forme neurologique tardive soit majoritairement lié aux formes humaines de la maladie et que les avortements associés à l'infection seraient principalement liés aux ruminants. De nombreuses questions en lien avec les mécanismes moléculaires associés à l'interaction RVFV-hôte restent en suspens, et notamment l'exploration des mécanismes en lien avec (i) la variabilité inter-individuelle et interspécifique de la pathologie, (ii) les facteurs viraux liés à la virulence de la souche, (iii) le rôle crucial de la réponse immunitaire précoce dans la résistance, (iv) le rôle de la réponse immunitaire dans la pathogenèse elle-même, (v) le rôle de la colonisation du compartiment sanguin dans le déclenchement des formes hémorragiques et (vi) le tropisme multicellulaire du RVFV (voie hématogène, récepteur(s)). Le rôle de l'immunité adaptative est crucial pour la mise en place de la production d'anticorps neutralisants, mais la pathogenèse du RVFV semble corrélée à la réponse inflammatoire précoce mise en place. Maîtriser la réponse inflammatoire précoce et les facteurs de variabilité permettrait de préciser et d'améliorer les stratégies thérapeutiques, que ce soit chez l'Homme, où il n'existe ni traitement spécifique ni vaccin, ou chez l'animal. De plus, aucun modèle animal ne semble développer de forme oculaire, rendant limitée la caractérisation de cette forme chez l'Homme, et donc sa prise en charge, encore difficile à l'heure actuelle.

Les conditions de maintien dans l'environnement du RVFV, ses interactions moléculaires avec ses vecteurs et la pathogenèse induite chez les espèces sensibles de la faune

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

sauvage restent également très peu caractérisées. Leur exploration permettrait d'améliorer la lutte par des moyens de prévention efficaces et adaptés. Le contexte écologique global actuel et la mondialisation sont propices à l'émergence/réémergence de pathogènes connus ou inconnus : modification de l'écologie des vecteurs, transports internationaux, commerces et mouvements de populations [8, 16, 108]. Les espèces capables de vectoriser le RVFV sont présentes sur de nombreux continents incluant l'Amérique du Nord et l'Europe, ce qui rend le risque de dissémination et d'émergence de la FVR sur ces deux continents non-négligeable [47, 48, 109].

Remerciements. Les figures ont été réalisées avec le logiciel en ligne BioRender.com.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Berge TO, Taylor RM. *International catalogue of arboviruses: including certain other viruses of vertebrates*. Washington : US Dept of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, 1975.

2. Kuno G, Chang G-JJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *CMR* 2005 ; 18 : 608-37.

3. Maes P, Alkhovsky SV, Bào Y, *et al*. Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Arch Virol* 2018 ; 163 : 2295-310.

4. Maes P, Adkins S, Alkhovsky SV, *et al*. Taxonomy of the order Bunyavirales: second update 2018. *Arch Virol* 2019 ; 164 : 927-41.

5. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, *et al*. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 2017 ; 162 : 2505-38.

6. Venter M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. *Curr Opin Virol* 2018 ; 28 : 74-84.

7. Javelle E, Lesueur A, Pommier de Santi V, *et al*. The challenging management of Rift Valley fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2020 ; 19 : 4.

8. Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, MacLachlan NJ. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc* 2009 ; 234 : 883-93.

9. Wanyoike F, Rich KM. An assessment of the regional and national socio-economic impacts of the 2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2010 ; 83 : 52-7.

10. EFSA, Nielsen SS, Nielsen SS, *et al*. Rift Valley fever: risk of persistence, spread and impact in Mayotte (France). *EFS2* 2020 ; 18 : e06093.

11. OIE. *Fièvre de la vallée du Rift*. Organisation mondiale de la santé animale. 2021. Disponible sur : https://www.oie.int/fr/maladie/fievre-de-la-vallee-du-rift [consulté le 21/07/2021].

12. Bird BH, McElroy AK. Rift Valley fever virus: unanswered questions. *Antiviral Res* 2016 ; 132 : 274-80.

13. WHO. *Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint*. Genève : Organisation mondiale de la santé, 2017.

14. Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from East Africa. *J Pathol* 1931 ; 34 : 545-79.

15. McMillen CM, Hartman AL. Rift Valley fever in animals and humans: current perspectives. *Antiviral Res* 2018 ; 156 : 29-37.

16. Gerdes GH. Rift Valley fever. *Rev Sci Tech* 2004 ; 23 : 613-23.

17. Kenawy MA, Abdel-Hamid YM, Beier JC. Rift Valley Fever in Egypt and other African countries: historical review, recent outbreaks and possibility of disease occurrence in Egypt. *Acta Trop* 2018 ; 181 : 40-9.

18. Arsevska E, Hellal J, Mejri S, *et al*. Identifying areas suitable for the occurrence of Rift Valley fever in North Africa: implications for surveillance. *Transbound Emerg Dis* 2016 ; 63 : 658-74.

19. Kardjadj M, Diallo A, Lancelot R. Transboundary animal diseases in Sahelian Africa and connected regions. In : Lancelot R, Arsevska E, Cêtre-Sossah C, *et al*, eds. *Rift Valley fever: one health at play?*. Cham : Springer, 2019, p. 121-48.

20. CDC. *Outbreak summaries: Rift Valley fever*. Center of disease control and prevention, 2020. Available from: https://www.cdc.gov/vhf/rvf/outbreaks/summaries.html [cited on 11/02/2021].

21. WHO. *Rift Valley fever.* Organisation mondiale de la santé, 2021. Disponible sur : http://www.who.int/csr/don/archive/disease/rift-valley-fever/en/ [consulté le 11/02/2021].

22. OIE-WAHIS. *Système mondial d'information zoosanitaire*. 2021 Disponible sur : https://wahis.oie.int/#/home [consulté le 21/07/21].

23. Métras R, Edmunds WJ, Youssouffi C, *et al*. Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020 ; 117 : 24567-74.

24. Youssouf H, Subiros M, Dennetiere G, *et al*. Rift Valley fever outbreak, Mayotte, France, 2018-2019. *Emerg Infect Dis* 2020 ; 26 : 769-72.

25. Freiberg AN, Sherman MB, Morais MC, Holbrook MR, Watowich SJ. Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography. *J Virol* 2008 ; 82 : 10341-8.

26. Ellis DS, Simpson DI, Stamford S, Abdel Wahab KS. Rift Valley fever virus: some ultrastructural observations on material from the outbreak in Egypt 1977. *J Gen Virol* 1979 ; 42 : 329-37.

27. Wichgers Schreur PJ, Kormelink R, Kortekaas J. Genome packaging of the Bunyavirales. *Curr Opin Virol* 2018 ; 33 : 151-5.

28. Bird BH, Khristova ML, Rollin PE, Ksiazek TG, Nichol ST. Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J Virol* 2007 ; 81 : 2805-16.

29. Grobbelaar AA, Weyer J, Leman PA, Kemp A, Paweska JT, Swanepoel R. Molecular epidemiology of Rift Valley fever virus. *Emerg Infect Dis* 2011 ; 17 : 2270-6.

30. Wright D, Kortekaas J, Bowden TA, Warimwe GM. Rift Valley fever: biology and epidemiology. *J Gen Virol* 2019 ; 100 : 1187-99.

31. Léger P, Lozach PY. Bunyaviruses: from transmission by arthropods to virus entry into the mammalian host first-target cells. *Future Virology* 2015 ; 10 : 859-81.

32. Bouloy M, Weber F. Molecular biology of Rift Valley fever virus. *Open Virol J* 2010 ; 4 : 8-14.

33. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol* 2007 ; 81 : 13335-45.

34. Ly HJ, Ikegami T. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins. *Virol J* 2016 ; 13 : 118.

35. Chevalier V, Pépin M, Plée L, Lancelot R. Rift Valley fever - a threat for Europe? *Euro Surveill* 2010 ; 19 : 705-8.

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

36. Lumley S, Horton DL, Hernandez-Triana LLM, Johnson N, Fooks AR, Hewson R. Rift Valley fever virus: strategies for maintenance, survival and vertical transmission in mosquitoes. *J Gen Virol* 2017 ; 98 : 875-87.

37. Christophers S. *Aëdes aegypti (L.) the yellow fever mosquito: its life history bionomics and structure*. New-York : Oxford University Press, 1960.

38. Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL. Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg* 1985 ; 95 : 197-209.

39. Olive M-M, Goodman SM, Reynes JM. The role of wild mammals in the maintenance of Rift valley fever virus. *J Wildl Dis* 2012 ; 48 : 241-66.

40. Oelofsen MJ, Van Der Rys E. Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus? *Onderstepoort J Vet Res* 1999 ; 66 : 51-4.

41. Beechler BR, Bengis R, Swanepoel R, *et al*. Rift Valley fever in kruger national park: do buffalo play a role in the inter-epidemic circulation of virus? *Transbound Emerg Dis* 2015 ; 62 : 24-32.

42. Manore CA, Beechler BR. Inter-epidemic and between-season persistence of Rift Valley fever: vertical transmission or cryptic cycling? *Transbound Emerg Dis* 2015 ; 62 : 13-23.

43. Michel AL, Bengis RG. The African buffalo: a villain for inter-species spread of infectious diseases in southern Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 2012 ; 79 : 5.

44. Britch SC, Binepal YS, Ruder MG, *et al*. Rift Valley fever risk map model and seroprevalence in selected wild ungulates and camels from Kenya. *PLoS One* 2013 ; 8 : e66626.

45. Linthicum KJ, Britch SC, Anyamba A. Rift Valley fever: an emerging mosquito-borne disease. *Annu Rev Entomol* 2016 ; 61 : 395-415.

46. Mulot M, Boissinot S, Brault V. Transmission of plant and vertebrate viruses by arthropods. *Virologie (Montrouge)* 2020 ; 24 : 177-92.

47. Brustolin M, Talavera S, Nuñez A, *et al*. Rift Valley fever virus and European mosquitoes: vector competence of *Culex pipiens* and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*): European mosquitoes as vectors of RVFV. *Med Vet Entomol* 2017 ; 31 : 365-72.

48. Turell MJ, Wilson WC, Bennett KE. Potential for North American mosquitoes (diptera: culicidae) to transmit Rift Valley fever virus. *J Med Entomol* 2010 ; 47 : 884-9.

49. Hoch AL, Gargan TP, Bailey CL. Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous diptera. *Am J Trop Med Hyg* 1985 ; 34 : 188-93.

50. Hartman A. Rift Valley fever. *Clin Lab Med* 2017 ; 37 : 285-301.

51. LaBeaud AD, Pfeil S, Muiruri S, *et al*. Factors associated with severe human Rift Valley fever in Sangailu, Garissa County, Kenya. *PLoS Negl Trop Dis* 2015 ; 9 : e0003548.

52. Evans A, Gakuya F, Paweska JT, *et al*. Prevalence of antibodies against Rift Valley fever virus in Kenyan wildlife. *Epidemiol Infect* 2008 ; 136 : 1261-9.

53. Lubisi BA, Ndouvhada PN, Neiffer D, Penrith ML, Sibanda D, Bastos A. Seroprevalence of Rift valley fever in South African domestic and wild suids (1999-2016). *Transbound Emerg Dis* 2020 ; 67 : 811-21.

54. Van den Bergh C, Venter EH, Swanepoel R, Hanekom CC, Thompson PN. Neutralizing antibodies against Rift Valley fever virus in wild antelope in far northern KwaZulu-Natal, South Africa, indicate recent virus circulation. *Transbound Emerg Dis* 2020 ; 67 : 1356-63.

55. Wilson WC, Kim IJ, Trujillo JD, *et al*. Susceptibility of white-tailed deer to Rift Valley fever virus. *Emerg Infect Dis* 2018 ; 24 : 1717-9.

56. Kading RC, Kityo RM, Mossel EC, *et al*. Neutralizing antibodies against flaviviruses, Babanki virus, and Rift Valley fever virus in Ugandan bats. *Infect Ecol Epidemiol* 2018 ; 8 : 1439215.

57. Nafady A, Bayoumi AH, El-Zaher MA, Youssef MS. Rift Valley fever. Pathological changes on the suspected buffalo calves and aborted foetuses Egypt. *Assiut Vet Med J (Egypt)* 1985 ; 14 : 95-102.

58. Alexander RA. Rift Valley fever in the union. *J S Afr Vet Assoc* 1951 ; 22 : 105-12.

59. Brand RF, Rostal MK, Kemp A, *et al*. A phytosociological analysis and description of wetland vegetation and ecological factors associated with locations of high mortality for the 2010-11 Rift Valley fever outbreak in South Africa. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0191585.

60. Ikegami T, Makino S. The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses* 2011 ; 3 : 493-519.

61. Pepin M, Bouloy M, Bird B, Kemp A, Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res* 2010 ; 41 : 61.

62. Weingartl HM, Zhang S, Marszal P, McGreevy A, Burton L, Wilson WC. Rift Valley fever virus incorporates the 78 kDa glycoprotein into virions matured in mosquito C6/36 cells. *PLoS One* 2014 ; 9 : e87385.

63. Moutailler S, Roche B, Thiberge JM, Caro V, Rougeon F, Failloux AB. Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus. *PLoS Negl Trop Dis* 2011 ; 5 : e1156.

64. Nfon CK, Marszal P, Zhang S, Weingartl HM. Innate immune response to Rift Valley fever virus in goats. *PLoS Negl Trop Dis* 2012 ; 6 : e1623.

65. Davies F, Martin V. Recognizing Rift Valley fever. *Veterinaria italiana* 2005 ; 42 : 31-53.

66. Odendaal L, Clift SJ, Fosgate GT, Davis AS. Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley fever virus infection in adult sheep. *Vet Pathol* 2019 ; 56 : 61-77.

67. Odendaal L, Davis AS, Fosgate GT, Clift SJ. Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley fever virus infection in young lambs. *Vet Pathol* 2020 ; 57 : 66-81.

68. Sendler M, Mayerle J, Lerch MM. Necrosis, apoptosis, necroptosis, pyroptosis: it matters how acinar cells die during pancreatitis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2016 ; 2 : 407-8.

69. Shlomovitz I, Zargarian S, Erlich Z, Edry-Botzer L, Gerlic M. Distinguishing necroptosis from apoptosis. *Methods Mol Biol* 2018 ; 1857 : 35-51.

70. Terasaki K, Makino S. Interplay between the virus and host in Rift Valley fever pathogenesis. *J Innate Immun* 2015 ; 7 : 450-8.

71. Odendaal L, Clift SJ, Fosgate GT, Davis AS. Ovine fetal and placental lesions and cellular tropism in natural Rift Valley fever virus infections. *Vet Pathol* 2020 ; 57 : 791-806.

72. Oymans J, Wichgers Schreur PJ, van Keulen L, Kant J, Kortekaas J. Rift Valley fever virus targets the maternal-foetal interface in ovine and human placentas. *PLoS Negl Trop Dis* 2020 ; 14 : e0007898.

73. Weingartl HM, Miller M, Nfon C, Wilson WC. Development of a Rift Valley fever virus viremia challenge model in sheep and goats. *Vaccine* 2014 ; 32 : 2337-44.

74. Coetzer JAW, Tustin RC. *Infectious diseases of livestock*. Goodwood : Oxford University Press, 2005.

75. Wuerth J, Weber F. Phleboviruses and the type-I interferon response. *Viruses* 2016 ; 8 : 174.

76. do Valle TZ, Billecocq A, Guillemot L, *et al*. A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever. *J Immunol* 2010 ; 185 : 6146-56.

77. McElroy AK, Nichol ST. 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* 2012 ; 422 : 6-12.

Copyright © 2021 John Libbey Eurotext. Téléchargé par CIRAD le 15/11/2021.

Annexe 2 : La fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Ouest : une pathologie zoonotique avec des conséquences socio-économiques multiples

One Health 17 (2023) 100583

Contents lists available at ScienceDirect

One Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/onehlt

Rift Valley fever in West Africa: A zoonotic disease with multiple socio-economic consequences

Bachirou Tinto [a,b,*,1], Jordan Quellec [a,c,1], Catherine Cêtre-Sossah [c], Amadou Dicko [d,e], Sara Salinas [a,2], Yannick Simonin [a,c,2]

[a] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France
[b] Laboratoire National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virale, Centre MURAZ, Institut National de Santé Publique (INSP), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
[c] ASTRE, University of Montpellier, CIRAD, INRAe, Montpellier, France
[d] Laboratoire central de référence, Institut National de Santé Publique (INSP), Ouagadougou, Burkina Faso
[e] Ministère de l'Agriculture, des ressources animales et halieutiques du Burkina Faso, Ouagadougou, Burkina Faso

ARTICLE INFO

Keywords:
Rift Valley fever virus
Population at risk
Multidimensional impacts
West Africa

ABSTRACT

Rift Valley fever virus (RVFV) is an arbovirus that causes Rift Valley fever (RVF), a zoonotic disease that mainly affects domestic and wildlife ruminants and humans. The first epidemic in North-Western and West Africa occurred in Senegal and Mauritania in 1987, two countries where RVF is now endemic. Slaughterhouse workers, farmers, herders and veterinarians are at high risk of exposure to RVF. Beyond the health threat, RVF is considered to cause major socio-economic problems, specifically in developing countries where livestock farming and trade are important economic activities. Indeed, the mortality rate linked to RVF infection can reach 95–100% in newborns and young animals. In West Africa, livestock production is a key factor for food production and for national economics. Epizootics caused by RVF can therefore have serious socio-economic consequences by impacting multisectoral economics, the psycho-social health of pastoral communities, and food security. Improving prevention strategies against RVF, including vaccination, enhancing knowledge of RVF and correcting any inappropriate behaviors by populations of endemics areas, as well as better monitoring of RVF ecological factors are effective ways to better foresee and control outbreaks of RVF and its socio-economical side-effects in countries at high risk of occurrence of the disease.

1. Introduction

Several arthropod-borne viruses (arboviruses) including dengue virus (DENV), chikungunya virus (CHIKV), West Nile virus (WNV) and yellow fever virus (YFV) are endemic in Africa and represent a heavy burden for the countries concerned [1]. The geographical distribution of these viruses is closely linked to the distribution of their biologically competent vectors as well as to environmental and climatic factors that favor their distribution [2]. Rift Valley fever (RVF) is a zoonotic arbovirosis that mainly affects ruminant livestock but also humans [3]. The RVF virus (RVFV), an arbovirus that belongs to the family *Phenuiviridae*, genus *Phlebovirus* [4].

RVFV has been responsible for numerous epidemics and epizootics in Africa, particularly in North Western (Mauritania) and Western Africa (Senegal) with a first epidemic that occurred in the two countries) in 1987 [5], Eastern (Egypt, Kenya, Tanzania) and Southern Africa (Mozambique, Namibia, South Africa) as well as in islands in the South-West Indian Ocean (Madagascar, Comoros archipelago) [6–10]. Until 2000, the circulation of RVFV was limited to Africa, after which the first cases outside the African continent were reported in Saudi Arabia and Yemen [11]. RVF was long considered to be a veterinary problem before gradually becoming a major public health problem upon the occurrence of the largest severe epidemic 1977 in Egypt [6]. Beyond being a health threat, RVF causes serious economic problems specifically in developing countries where livestock breeding and trade are two major economic activities. In 1951, epizootics of RVF in South Africa caused nearly

* Corresponding author at: Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, University of Montpellier, INSERM, Etablissement Français du Sang, Montpellier, France.
E-mail address: tintobachirou@yahoo.fr (B. Tinto).
[1] These 2 authors participated equally to the work.
[2] These 2 authors co-leaded the work.

https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100583
Received 20 February 2023; Received in revised form 12 June 2023; Accepted 12 June 2023
Available online 14 June 2023
2352-7714/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

100,000 deaths among sheep [12]. It is therefore crucial that low-income countries, including several countries in Northern and Western Africa, set up surveillance programs to better foresee outbreaks in the animal and human sectors to enable better management of the disease and of their socio-economic side-effects in a One Health context.

2. Occurrence of RVF in West Africa

As early as 1912, cases of enzootic hepatitis, one of the main symptoms of RVFV infection, had already been reported in sheep long before the first description of clinical cases in sheep, cattle and humans in Kenya in 1930 [13]. Since then several epidemics and epizootics of RVF have been notified but only in sub-Saharan Africa until the 1990s, when the virus spread outside the African continent [10,14]. RVFV is now endemic in several countries in North-Western Africa [15] (Fig. 1). Data suggest that the first outbreak of RVF in North-Western Africa occurred in 1987 in Senegal and Mauritania during floods in the lower Senegal River delta [5]. However, serological surveys of animal samples in Burkina Faso and Senegal between 1985 and 1987 showed that the virus was already circulating in West Africa by then [16–18].

Mauritania is one of the countries in North-Western Africa that has experienced most of the reported outbreaks of RVF. In 2010, 30 human cases and 26 animal cases (goats, sheep and camels) were reported and a role for camel species (*Dromedarius camelus*) in local virus amplification was suggested for the first time [19,20]. In 2015 and again in 2020, respectively 31 and 78 cases of RVF in humans were confirmed [21,22]. Even more recently, in 2022, 47 human cases were documented including 23 human deaths [23]. Seven species of mosquitoes known to be RVFV vectors belonging to three genera (*Culex* spp., *Aedes* spp., *Mansonia spp*), were detected in Mauritania [22]. In Senegal, RVFV has been repeatedly reported in humans, livestock, and mosquitoes [24–29], especially in the Sahelian and Sudano-Guinean zones. Senegal confirmed 11 human RVF cases during an outbreak in 2013–2014 and 75% of the animals analyzed during this period tested positive for anti-RVF IgG [30]. Gambia reported an outbreak affecting humans and animals in 2002–2003, before reporting a single isolated case in 2018 [31,32]. In Burkina Faso, analysis of 520 samples collected from cattle, goats and sheep between 2005 and 2007 revealed an RVF specific antibody prevalence rate of 7.67% [33]. In 2017, a sporadic case in Mali as well as an outbreak in Nigeria were reported [34,35]. In 2016, Niger experienced its first RVF epidemic with 399 suspected cases reported, including 17 confirmed cases [36]. The epizootics that occurred in West Africa showed that the most affected animals were camelids, sheep, cattle and goats [20,33,36].

3. Routes of transmission

RVFV, an enveloped single-stranded negative sense RNA virus comprising three segments (large segment (L), medium segment (M) and small segment (S)) [49] is transmitted to humans and animals either by the bite of an infected mosquito or by aerosol exposure through body fluids, blood and tissues of infected animals [50,51]. The vectors mainly involved in the transmission of RVFV are blood-sucking mosquitoes (*Culex, Aedes, Mansonia, Anopheles*) [52] More than 65 species have been identified as potential vectors of RVFV with varying levels of competence [52], most of the mosquitoes concerned belong to the genus *Aedes* and *Culex* [52]. Vertical transmission of RVFV is described in the vector, notably of the *Aedes* genus, and *Aedes* eggs are able to resist several years to desiccation and hence potentially contribute to the endemicity of RVFV [52,53]. Laid infected eggs may therefore survive the dry season

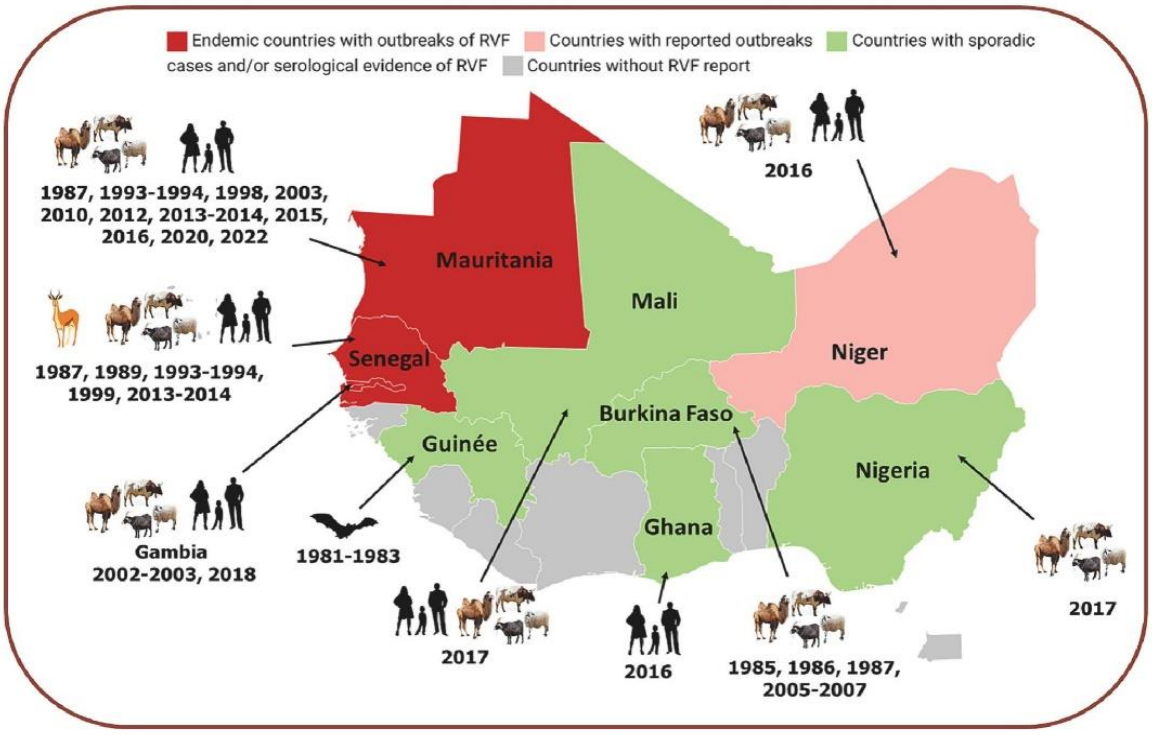


Fig. 1. Geographical distribution of RVF in North-Western and West Africa. Countries that are endemic with RVFV notified epidemics are colored red; countries with sporadic cases and/or serological evidence of RVFV circulation are colored green; countries that have reported some outbreaks of RVFV are colored pink; and countries where no data are available on RVFV are colored gray; The dates are the years RVF cases were reported in the species in which the diagnosis was made. Map adapted from [5,16,17,19,22,23,29–33,35–48] (Map was made with Datawrapper.de). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and hatch during the following rainy season, providing infected adult mosquitoes ready to bite [54]. Climatic factors, such as rainfall or flooding that lead to massive hatching of RVFV infected eggs, can cause immediate epizootics via massive infection of livestock [55]. Other arthropods, including biting midges, ticks and sandflies have been described as mechanical vectors of RVFV [52]. In West Africa, the virus was isolated from *Culex antennatus* in Nigeria in 1967 and 1970, from *Aedes dalzieli* in Senegal in 1974 and in 1983 from *Aedes furcifer* and *Aedes cumminsii* in Burkina Faso [24]. The species *Aedes vexans*, *Culex poicilipes* and *Culex quinquefasciatus* have been shown to be competent vectors for transmission of RVFV in Senegal [56]. Apart from domestic livestock which are the most frequently infected animal populations, wildlife animal species including antelopes, giraffes, African buffaloes, black rhinoceros, African elephants, and some species of bats and rodents appear to be involved in RVFV transmission cycle [54,57–61]. However, ruminants are the amplifying hosts of RVFV [62] (Fig. 2). Two potential maintenance mechanisms of RVFV in the environment leading to RVFV emergence have not yet been elucidated: the first is vertical transmission of RVFV in *Aedes* mosquito species playing both vector and reservoir roles, notably in dry regions. The second is an unknown sylvatic cycle combining a reservoir specie(s) of wildlife mammals and one or more vector(s), notably in regions with abundant wildlife [54]. Thus, environmental factors, including rainfall, wildlife diversity and the density of hosts and reservoirs, vector species, and animal movements play a key role in the emergence of RVF epizootics [55,63–66].

In animals, transmission most often occurs through a mosquito bite rather than through direct contact [67]. Experiments carried out with sheep with acute RVFV infections and immunocompromised sheep showed no transmission of the virus to the latter [68], but direct transmission between goats has already been demonstrated [69] and vertical transmission has also been demonstrated in cattle and sheep [70–72]. Studies have shown that there is strong viral replication in the placenta of rodents and sheep [70,71,73]. The main mode of transmission in humans remains direct contact with body fluids, blood and tissues of infected animals that occurs mainly during the slaughter of infected animals, the handling of sick animals during veterinary procedures and the consumption of undercooked or raw animal products [64,74,75]. No cases of direct horizontal human-to-human transmission have been reported to date [67]. Cases of vertical transmission have been reported in some patients, as well as efficient replication of RVFV in human placental explants, but the threat of RVFV to pregnant women and their newborns remains uncertain [70,76–78].

4. Clinical manifestations

4.1. In animals

Several domestic and wildlife animals species have been identified as susceptible hosts to RVFV: ovine, caprine, bovine, cameline species [19,59,60,79,80]. The clinical picture of the disease in animals varies with the species and ranges from highly susceptible to resistant, depending on the age of the animal, younger animals being more severely affected [81,82]. Clinical manifestations include fever, anorexia, weakness, apathy with an increase in the amplitude of respiratory movements (hyperpnea) [83–85]. Some animals develop diarrhea, sometimes bloody runny nose and jaundice [86]. The mortality

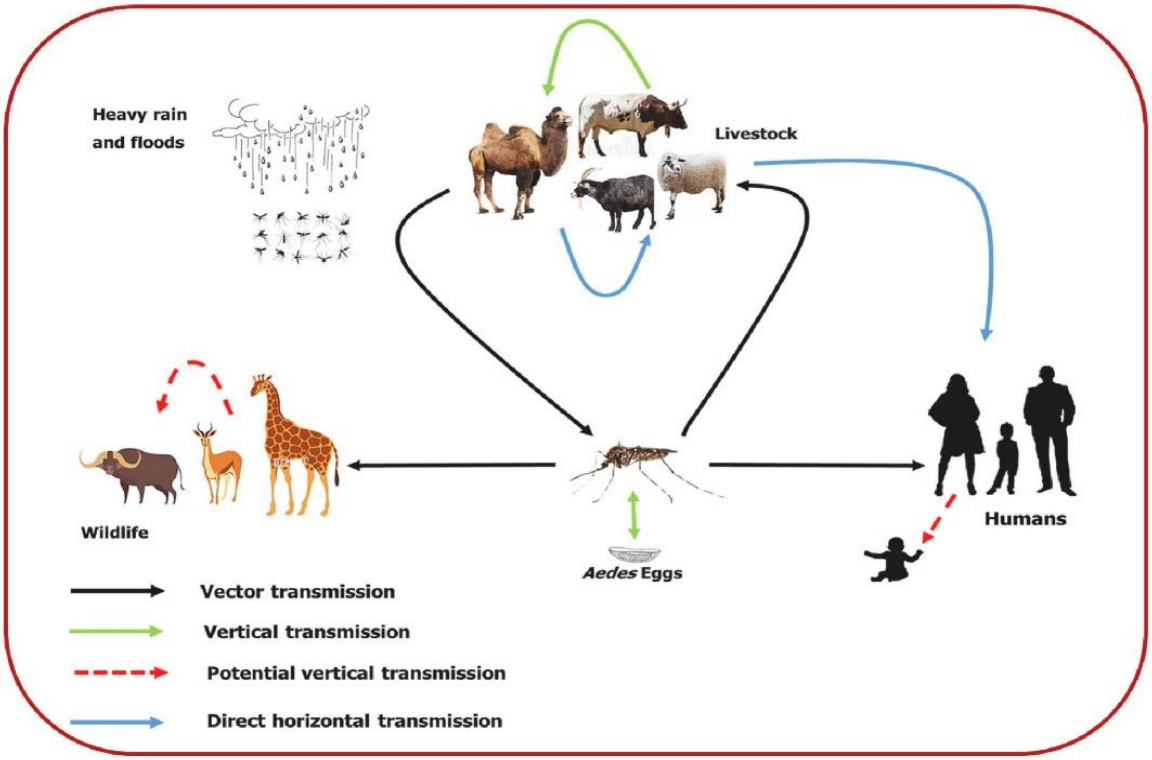


Fig. 2. Transmission cycle of RVFV showing the known transmission routes: (i) Direct transmission (by contact) among livestock (blue arrow); (ii) Humans are infected via two routes, vector-based transmission (mosquito bite) (black arrow) or direct contact transmission (exposure to the body fluids, blood and tissues of infected animals) (blue arrow); (iii) Vertical transmission in vectors (trans-ovarian transmission), in animals (transmission from a pregnant female to her offspring) and in humans (mother-to-child transmission) (green arrow); (iv) The enzootic cycle involves wildlife reservoirs potentially infected by specific mosquito species; (v) Potential vertical transmission in wild animals (dashed red arrow) (Figure was made with PowerPoint 2019 software). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

rate can reach above 90–100% in newborn and young lambs [64,86]. In these animals, death can occur as soon as two days after the onset of the disease. Although they are also infected by RVFV, adult animals seem to be more resistant to the disease (20–30% mortality) [3,86]. RVFV replicates in the liver of animals, causing liver damage and hemorrhages resulting in bloody diarrhea [64,81]. Sheep and goats are more likely to die than cattle [86,87]. Cattle show less severe symptoms, with an adult mortality rate of 5–10%, but in calves, the rate varies from 10 to 70% [3,87]. The most striking sign during RVF epizootics is the wave of abortions that occurs in livestock, with high mortality in younger animals [3]. The abortion rate can reach 100% in pregnant ewes at any time during gestation [3,88,89]. In wildlife, the disease is most often asymptomatic, although cases of abortions have been reported in some species [58,90,91].

4.2. In humans

In humans, the disease is mostly asymptomatic but can evolve into serious forms leading to death [3,92]. The case fatality rate is between 0.5% and 2% but may be higher in some outbreaks [7,93,94]. For instance, in North-Western and West Africa, case fatality rates ranging from 9 to 32% have been reported in outbreaks in Niger and Mauritania [14,22]. The incubation period is 2 to 6 days after exposure to RVFV [95] and the majority of patients develop asymptomatic forms or mild symptoms such as fever, flu syndrome, nausea and digestive disorders. However, 5–20% of symptomatic patients develop severe hepatic, hemorrhagic, neurological or ocular forms [3,62]. In all species, RVFV replicates primarily in the liver [96,97] causing hepatic necrosis, jaundice and hemorrhagic disease [6,98]. However, less than 5% of these patients develop hemorrhagic forms such as epistaxis, gingivorrhagia and hematuria with a very high mortality rate [95] and death usually occurs one to two weeks after the onset of hemorrhagic syndromes [99]. Moreover, neurological damage has been reported in 1–5% of cases but may be higher: in the 2020 epidemic in Mauritania, 38% (30/78) of the persons infected by RVFV developed neurological signs [21,22,95,100]. Neurological damage generally occurs 1 to 4 weeks post infection and sometimes after 60 days post infection [95]. Linked to meningoencephalitis, neurological manifestations are dizziness, visual hallucinations, stiff neck, memory loss, tremors or convulsions, and can lead to definitive sequalae, coma or death [3,101]. Ocular complications occur in 10% of the infected human population [95] and lead to decreased vision, photophobia, retinitis and retro-orbital pain [101]. In some cases, there is retinal hemorrhage and definitive blindness [101]. Ocular symptoms occur within 2–7 days and may persist for up to 2 weeks after onset of illness [101]. Finally, in some patients, RVFV infection also causes acute renal failure with an increase in serum creatinine and urea revealed upon biological examination [102,103].

5. Populations at risk

The risk of exposure to RVFV infection is related to their activities and to the environment. Activities involving animals increase the risk of infection due to the close contact between human beings and infected animals, which is the main transmission route of RVFV to humans. Thus, people working in slaughterhouses, farmers, people living in livestock raising areas, laboratory workers and veterinarians constitute a population at risk. Handling meat from RVFV-infected animals exposes slaughterhouse workers to the risk of RVFV contamination and these people are more exposed to the risk of contamination by RVFV than other populations [104,105]. Because their activity involves handling infected or dead animals or infected samples, veterinarians, laboratory workers and farmers can also be exposed to risks of contamination [74,106–108]. In addition, farmers and people who live in endemic and pastoral areas are permanently exposed to mosquito bites, another possible transmission route of RVFV [109,110]. Furthermore, the consumption of unpasteurized milk or meat from sick or dead animals by populations in endemic areas exposes these populations to risks of contamination [111,112].

In West Africa, agriculture is the leading sector of employment and employs more than 60% of the active workforce [113], suggesting that a significant population in West Africa is at risk of exposure to RVFV. Indeed, in 2012, during RVF outbreaks in Mauritania, it was reported that 99% of the infected human population originated from rural areas and all were involved in agro-pastoral activities, as was the case in 2020, when 60% of the confirmed cases were farmers [22,114]. Likewise, during the 2016 RVF epidemic in Niger, pastoralists were the most affected population: 34% of the total number of cases and 85% of the total number of deaths [36].

6. Multidimensional impacts of Rift Valley fever

By impacting livestock and human health, RVF also represents a multidimensional socio-economic threat (Fig. 3) [115]. The socio-economic consequences vary with the country and depend on the importance of pastoralism in the country's economic system. For example, the 2007 outbreak of RVF in Kenya induced a 48% drop in national production compared to the 14% loss caused by the outbreak of RVF in Yemen in 2000 [115]. Pastoralism plays an important role throughout Africa and is crucial for some economies like in the Horn of Africa [115–117]. For example, in Kenya, livestock represents 90% of income and in Sudan, the livestock sector employs 40% of the population [116,118].

➢ *Multi-sectoral and multi-scale economic disturbances in Africa*

Given the few economic assessments that are available during RVFV outbreaks, economic studies have mainly used mathematical approaches i.e. modeling and simulations [115]. At the individual and household scale in pastoral communities, livestock is the main source of both income and food (red meat and milk) [119,120]. Thus, livestock mortality and abortions represent a significant monetary loss for individual producers by reducing their activity and meat trade in the short term. The secondary effects linked to the presence of the disease can last for several generations of animals by disturbing herd dynamics thereby becoming a long term problem [117].

At community scale, disruption of red meat markets and of the milk trade can disturb all the livestock marketing chains by stopping or delaying sales, and hence affecting all the actors of the downstream marketing chain including producers, slaughterhouses, traders and butchers, but also associated non-agricultural sectors [118,121]. Indeed, at community scale, the occurrence of RVF leads to a reduction in rural livelihoods and in the value of agricultural products (crops, milk and meat, animal, fruits, vegetables), and affects large parts of the local economy. In Kenya, a cross-sectional household survey showed that 70–92% of pastoral households depend on the income they get from the sale of livestock [118,122].

Linked to the disruption of the community-based economy, RVF outbreaks also have an impact on the national and global economy [115,117,118]. Indeed, disruption of the livestock marketing chain and the fall in the sale of red meat and derived animal products also impact urbanized areas by reducing household supplies and interrupting livestock-related urban industry and auxiliary services: reduced activity, increased unemployment, and decreasing incomes. These impacts on urbanized areas then lead to a decrease in non-agricultural sectors (trade, transport, tourism, petroleum) and finally to significant financial loss at national scale [115–118,121,123]. For example, it was estimated that the 2007 RVF outbreak in Kenya led to a loss of US$ 32 million [118]. Moreover, RVF results in bans on livestock trade not only at the national, but also at an international level for countries with international animal trade like in the Horn of Africa [124–126]. Imports of animals and fresh meat from countries or zones not free of RVF (epizootic or inter-epizootic periods) are complicated by the

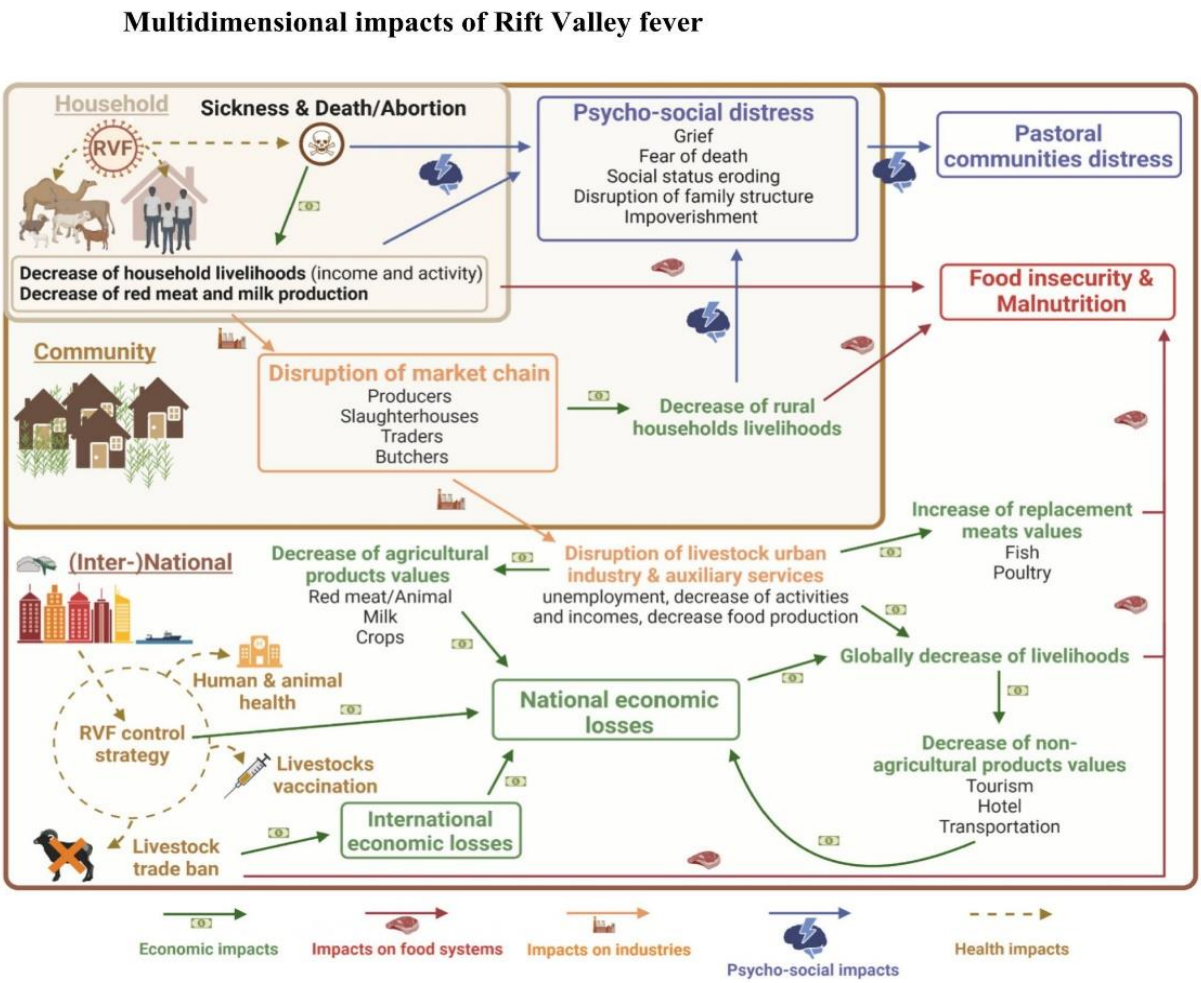


Fig. 3. Schematic representation of the multidimensional socio-economic effects of RVF at household, community and international scales. The colour code distinguishes impacts on the different sectors: the orange arrow with a factory symbol for the livestock industry, the purple arrow with a brain symbol for the psycho-social effect on the population, the red arrow with a red meat symbol for food systems, the green arrow with a US dollar, symbol for economic impacts and finally, the dark yellow dashed arrow for the health impact of RVFV (pathology, control strategy). The boxed texts represent the major impacts of the sector according to the colour code and the scale (Figures was made with BioRender.com). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

recommendations of the WOAH Terrestrial Animal Health Code. This code complicates trade in animals or animal products by making it necessary to obtain an international veterinary certificate justifying the absence of infection in the animals (vaccination status, quarantine, absence of symptoms, transport conditions, …) or in the meat (approved slaughterhouse, post-mortem examination, etc.) [127]. Likewise, public health, healthcare and national RVF control measures have a significant impact on the country's economy. The cost of managing human and animal deaths, the care required by human and animal RVF (treatment, hospitalization, veterinary care) and the control measures (control of animal movements and trade, livestock vaccination strategies) entail significant costs for the national economies of the affected countries. The status of being endemic for RVF can involve long-term economic costs due to irregular and recurrent RVF outbreaks as well as to unexpected costs for disease control [115,128].

➢ *Psycho-social impact and food security threat in Africa*

The occurrence of RVF can lead to significant psycho-social distress in pastoral communities. Indeed, for RVF diseased households, grief over the death of family members or close relatives, the fear of death and of the loss of livestock and/or production have been described as important deleterious psychological factors [111,121,129]. In addition, impoverishment and the decrease in rural household livelihoods were perceived by pastoral communities as major threats of RVF outbreaks [111,121,129]. Not only diseased families feel psychological distress due to RVF threats, many individual inhabitants of pastoral areas, from livestock farmers to people in non-livestock sectors, also suffer from similar symptoms [121]. For some communities, livestock farmers' status is associated with pride, prestige and influence, and, during an RVF outbreak, ruminants at risk temporally loose their economic, nutritional and social value. Thus, in addition to the potential impact on family structure and impoverishment, means the social status of most livestock farmers in RVF epidemic areas is seriously eroded resulting in psycho-social distress for pastoral communities [111,119].

Finally, the food security of populations is seriously affected during outbreaks of RVF. Associated with the drop in food production, loss of rural and urban household livelihoods, an increase in the price of

alternative sources of meat to compensate for the lack of red meat, and disruption of the food system disruption caused the ban on animal trade leads to significant food insecurity and particularly, to malnutrition [111,118,119,121,122]. Reports on the RVF outbreak in Kenya in 2020 showed that the consumption of meat declined and that a high proportion of people did not reach the minimum dietary score and consumed insufficient protein rich food [122].

➢ *West Africa, an area with potentially high socio-economic impacts*

Despite the numerous epidemics and epizootics experienced by several countries in West Africa, to date no studies have been undertaken to assess the psycho-social impacts and economic losses caused by RVF in these countries. Based on total animal production in Africa as a whole, West Africa represents 23% of cattle production, 25% of sheep production and 44% of goat production. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-UN), West Africa had 76 million heads of cattle and 279 million small ruminants in 2019 [130]. In Niger for example, the annual production of all animal species combined was US$ 315 million [131]. In many West African countries, the livestock sector represents approximately 44% of the agricultural gross domestic product (GDP), the sector is a crucial source of income for the poorest populations and provides employment for young people in semi-rural areas [132]. Given the importance of pastoralism in West African economies, and the psycho-social, health, food security and economic threats of RVF at national scale, RVF represents a major threat for West African countries. It is thus crucial to assess the potential impacts of RVF on the national economies in order to prioritize efficient disease and resource allocation for surveillance and control in these countries. It is also crucial to understand the psycho-social consequences of RVF in West Africa to be able to support populations efficiently during outbreaks thereby limiting large-scale psycho-social distress [115,133].

7. General treatment and prevention

As is the case of most arboviral diseases, no effective specific RVF treatment is available for either humans or animals. Management of human cases of RVF consists of general supportive therapy with symptomatic and non-specific treatments [95]. The prevention of RVFV in animals is an effective way to limit the occurrence and transmission of RVFV to humans [134]. Vaccination of animals can limit the occurrence, spread and impacts of the disease [134–136]. Some authors who studied the 2018/2019 outbreak of RVF in Mayotte, reported that the immune status of livestock was correlated with RVF re-emergence [135]. Several RVF vaccines for animals have been developed, some of which are available commercially, but no RVF vaccine is authorized for humans. World Health Organization (WHO) recommends vaccinating animals against RVF with the live-attenuated type of vaccine in endemic areas to prevent epizootics [62,137–140]. However, in many endemic countries lack clear vaccination policies and strategies, livestock vaccination is not routinely advised [138,141].

In addition to vaccination, other prevention strategies can limit the (re)emergence of RVF in ruminant livestock and human populations at risk. Firstly, livestock infection could theoretically be prevented through control of competent RVFV vectors, but it appears that the great diversity of competent vectors with distinct ecological behaviors makes this strategy unrealistic [52]. However, vector ecology and risk areas can be surveyed and forecasts produced using high-resolution SPOT-5 satellite images [142]. Given the important role of climatic factors in the occurrence of RVF, defining areas at risk using ecological and environmental factors (intensity, frequency of rainfall, type of vegetation) will help to better predict RVF epizootics in livestock [111,122,143,144].

Socio-economic factors also play a determining role in RVFV transmission [145], and human behaviors and habits could be improved to better prevent RVFV transmission to humans. Firstly, professional populations at risk of RVFV infection, including veterinarians, farmers and slaughterhouse workers, need to (i) be better informed and trained to recognize the specific clinical signs of RVF and (ii) wear the recommended personal protective clothing and use appropriate equipment in any suspected cases of RVF [95]. Indeed, during a cross-sectional survey after the 2007 RVFV outbreak in Tanzania, only 24.3% of farmers reported using protective clothing and equipment to handle sick or dead animals [112]. Secondly, improving knowledge of RVF and correcting unsuitable behaviors in all at-risk populations appears to be an efficient way to prevent or limit the occurrence of RVF [146]. Several studies in East Africa have shown that populations in RVFV endemic or non-endemic areas have variable but limited knowledge concerning RVF that can act as barriers to the adoption of protective measures or control strategies. Misconceptions or insufficient knowledge about RVF, notably about the clinical manifestations of RVF, routes of transmission or RVF ecological risk factors, are significant but variable factors in different countries or regions [112,119,121,145]. For example, studies conducted after the 2007 RVF outbreak in Tanzania highlighted significant variability between individuals and between different regions in the country: from 1.3% to 50% of interviewees were cited as being knowledgeable about RVF [112,121]. These misconceptions are often described as a key factor in the transmission of RVFV to humans in some populations. Likewise, even though populations have experienced several outbreaks, they continue their inappropriate dietary habits (consuming milk or meat from dead animals), living with animals, and ways of dealing with animal sickness (i.e., the farmers treat the animals themselves instead of a veterinarian) thereby multiplying the risk of human transmission [112,119,121,129,145]. Several ways of raising public awareness about RVF have been recommended for the control of RVF throughout the African continent and are therefore valid for West Africa.

Controlling legal or illegal movements of animal and trade in animal products in endemic areas bordering other countries is of great help in limiting the spread of RVFV [117,121]. Illegal animal trade between mainland Africa and the island of Mayotte was reported to be the main cause of RVF re-emergence that led to the outbreak of RVF in Mayotte in 2018/2019 [123]. Improving prevention, the control strategies and the infrastructure of the health system are among the main ways to avoid future RVF outbreaks. The limited diagnostic capacity, lack of an emergency plan and of intersectoral coordination limit the efficiency of prevention and control measures [117,121]. In addition, national control measures led to the isolation of diseased pastoral communities thereby encouraging mistrust of the formal healthcare system [129]. It is thus crucial to improve communication between national health systems, international medical personnel, and pastoral communities not only to ensure correct application of prevention and control strategies, but also to limit psycho-social distress in diseased populations [129].

Lastly, multidisciplinary research on RVF in the context of a One Health approach will help foresee and alert RVF outbreaks: animals, humans, and the environment (vectors, climate, etc.) are all part of the RVFV transmission cycle [116,136,147]. Characterization of the enzootic maintenance mechanisms of RVFV in the wildlife and entomology sectors, as well as the use of mathematical models that include ecological factors, vectors and host parameters, will in turn, enable better characterization of RVF emergence, maintenance and circulation in endemic or non-endemic areas, within and potentially outside Africa [3,118,147–150]. In this sense, some countries in North-Western Africa, like Mauritania, have already drawn up a national plan to promote early detection of RVF outbreaks. This plan include (i) the environmental factors that define regions at risk of introduction or exposure through quantitative risk analysis [144] and (ii) the animal health component with serological monitoring campaigns of sentinel herds in these regions during the season when the animals are at risk of exposure to RVFV [22]. Furthermore, in response to the 2016 RVFV outbreaks in West Africa, notably in Niger, a multidisciplinary program has been set up by FAO-UN and West African countries [151]. The aim of the project "Preparation of a regional program for Rift Valley fever prevention and control

in Benin, Burkina Faso, Mali, Niger and Nigeria", is to design regional strategies to better prevent and control RVF outbreaks using a One Health Approach. The program is already underway in Senegal and Mauritania and includes (i) mapping of regions at risk of animal movements and that contain risky ecological factors, (ii) international collaboration with sharing of expertise and knowledge, (iii) public and professional awareness-raising and (iv) the creation of an emergency plan. Since 2004, this multidisciplinary approach has also been used at a global scale in the 'Global Framework for the Progressive Control of Transboundary Animal Disease (GF-TADs), set up by FAO-UN, WOAH with the participation of WHO [141,152]. The aim of this program is to improve the prevention, detection and control of animal diseases including RVF and to identify gaps, enhance diagnostic capacities and explore difficulties that could be responsible for the absence of surveillance programs in a particular country.

8. Conclusion

RVF, a serious animal and human public health problem, is now endemic in several countries in West Africa where cattle breeding and trade are of major economic importance. These countries contain a high proportion of at-risk populations and are exposed to huge economic losses due to epidemics/epizootics caused by RVF. RVF is also a threat to human health, to the psycho-social status of pastoral communities and to the food security of countries in North-Western and West Africa. Further in-depth studies are needed to better measure the socio-economic consequences of RVF for the different populations. The best disease control strategy remains the protection of livestock and the definition of clear vaccination strategies that can be applied in practice, and the identification and implementation of effective ways of forecasting and controlling epidemics in countries at high risk of RVF occurrence. Improving the education of professionals who work with livestock, reducing misconceptions about RVF and correcting inappropriate behaviors in local populations are potentially effective ways of controlling RVF outbreaks. Given the link between the health of the environment and that of both animal and human hosts in RVF outbreaks, we recommend affected countries promote control strategies based on a One Heath approach. Indeed, several environmental factors characterize the emergence, maintenance and outbreaks of RVF, and it is crucial to identify exactly which factors are involved to better forecast the emergence and/or outbreaks of RVF. As human epidemics and their side effects are directly linked to animal epizootics, it is important to protect livestock not only to limit the side-effects of RVF outbreaks on human health, but also to improve the monitoring and care of animal epizootics. Sentinel herds should be used in at-risk regions and livestock workers' knowledge needs to be improved to prevent or at least reduce the dissemination and the direct/indirect impacts of RVF outbreaks on animal and human health. Prevention must apply to all compartments of the disease transmission cycle to prevent emergence and to provide efficient care in the case of re-emergence of RVF.

Declaration of Competing Interest

None.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

[1] M. Venter, Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin, Curr. Opin. Virol. 28 (2018) 74–84, https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2017.11.004.
[2] M.C. Thomson, Á.G. Muñoz, R. Cousin, J. Shumake-Guillemot, Climate drivers of vector-borne diseases in Africa and their relevance to control programmes, Infect. Dis. Poverty. 7 (2018) 1–22, https://doi.org/10.1186/s40249-018-0460-1.
[3] J. Quellec, S. Salinas, Y. Simonin, C. Cêtre-Sossah, Rift valley fever virus infection: physiopathology and pathogenesis, Virologie. 25 (2021) 263–279, https://doi.org/10.1684/VIR.2021.0919.
[4] P. Maes, S.V. Alkhovsky, Y. Bào, M. Beer, M. Birkhead, T. Briese, M.J. Buchmeier, C.H. Calisher, R.N. Charrel, I.R. Choi, C.S. Clegg, J.C. de la Torre, E. Delwart, J. L. DeRisi, P.L. Di Bello, F. Di Serio, M. Digiaro, V.V. Dolja, C. Drosten, T. Z. Druciarek, J. Du, H. Ebihara, T. Elbeaino, R.C. Gergerich, A.N. Gillis, J.P. J. Gonzalez, A.L. Haenni, J. Hepojoki, U. Hetzel, T. Hồ, N. Hóng, R.K. Jain, P. Jansen van Vuren, Q. Jin, M.G. Jonson, S. Junglen, K.E. Keller, A. Kemp, A. Kipar, N.O. Kondov, E.V. Koonin, R. Kormelink, Y. Korzyukov, M. Krupovic, A. J. Lambert, A.G. Laney, M. LeBreton, I.S. Lukashevich, M. Marklewitz, W. Markotter, G.P. Martelli, R.R. Martin, N. Mielke-Ehret, H.P. Mühlbach, B. Navarro, T.F.F. Ng, M.R.T. Nunes, G. Palacios, J.T. Pawęska, C.J. Peters, A. Plyusnin, S.R. Radoshitzky, V. Romanowski, P. Salmenperä, M.S. Salvato, H. Sanfaçon, T. Sasaya, C. Schmaljohn, B.S. Schneider, Y. Shirako, S. Siddell, T. A. Sironen, M.D. Stenglein, N. Storm, H. Sudini, R.B. Tesh, I.E. Tzanetakis, M. Uppala, O. Vapalahti, N. Vasilakis, P.J. Walker, G. Wáng, L. Wáng, Y. Wáng, T. Wèi, M.R. Wiley, Y.I. Wolf, N.D. Wolfe, Z. Wú, W. Xú, L. Yang, Z. Yáng, S. D. Yeh, Y.Z. Zhāng, Y. Zhèng, X. Zhou, C. Zhū, F. Zirkel, J.H. Kuhn, Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018, Arch. Virol. 163 (2018) 2295–2310, https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5.
[5] J.P. Digoutte, C.J. Peters, General aspects of the 1987 Rift valley fever epidemic in Mauritania, Res. Virol. 140 (1989) 27–30, https://doi.org/10.1016/S0923-2516(89)80081-0.
[6] L.W. Laughlin, J.M. Meegan, L.J. Strausbaugh, D.M. Moren, R.H. Watten, Epidemic rift valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., Trans R Soc Trop Med Hyg (1979) 630–633, https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90006-3.
[7] P.M. Nguku, S.K. Sharif, D. Mutonga, S. Amwayi, J. Omolo, O. Mohammed, E. C. Farnon, L.H. Gould, E. Lederman, C. Rao, R. Sang, D. Schnabel, D.R. Feikin, A. Hightower, M.K. Njenga, R.F. Breiman, An investigation of a major outbreak of rift valley fever in Kenya: 2006-2007, Am. J. Trop. Med. Hyg. 83 (2010) 5–13, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0288.
[8] M. Mohamed, F. Mosha, J. Mghamba, S.R. Zaki, W.J. Shieh, J. Paweska, S. Omulo, S. Gikundi, P. Mmbuji, P. Bloland, N. Zeidner, R. Kalinga, R. F. Breiman, M.K. Njenga, Epidemiologic and clinical aspects of a Rift Valley fever outbreak in humans in Tanzania, 2007, Am. J. Trop. Med. Hyg. 83 (2010) 22–27, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0318.
[9] R. Métras, T. Porphyre, D.U. Pfeiffer, A. Kemp, P.N. Thompson, L.M. Collins, R. G. White, Exploratory space-time analyses of Rift Valley fever in South Africa in 2008-2011, PLoS Negl. Trop. Dis. 6 (2012), e1808, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001808.
[10] J. Morvan, J.F. Saluzzo, D. Fontenille, P.E. Rollin, P. Coulanges, Rift valley fever on the east coast of Madagascar, Res. Virol. 142 (1991) 475–482, https://doi.org/10.1016/0923-2516(91)90070-J.
[11] T.A. Madani, Y.Y. Al-Mazrou, M.H. Al-Jeffri, A.A. Mishkhas, A.M. Al-Rabeah, A. M. Turkistani, M.O. Al-Sayed, A.A. Abodahish, A.S. Khan, T.G. Ksiazek, O. Shobokshi, Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics, Clin. Infect. Dis. 37 (2003) 1084–1092, https://doi.org/10.1086/378747.
[12] R.A. Alexander, Rift valley fever in the union |, J. S. Afr. Vet. Assoc. 22 (1951) 105–109. https://journals.co.za/doi/abs/10.10520/AJA00382809_501 (accessed May 24, 2023).
[13] R. Daubney, J.R. Hudson, P.C. Garnham, Enzootic hepatitis or rift valley fever. An undescribed virus disease of sheep cattle and man from east africa, J. Pathol. Bacteriol. 34 (1931) 545–579, https://doi.org/10.1002/path.1700340418.
[14] D.M. Watts, A. El-Tigani, B.A.M. Botros, A.W. Salib, J.G. Olson, M. McCarthy, T. G. Ksiazek, Arthropod-borne viral infections associated with a fever outbreak in the Northern Province of Sudan, J. Trop. Med. Hyg. 97 (1994) 228–230. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8064945/ (accessed May 27, 2023).
[15] M.A. Kenawy, Y.M. Abdel-Hamid, J.C. Beier, Rift Valley fever in Egypt and other African countries: historical review, recent outbreaks and possibility of disease occurrence in Egypt, Acta Trop. 181 (2018) 40–49, https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.015.
[16] A.J. Akakpo, M.J.R. Some, P. Bornarel, A. Jouan, J.P. Gonzalez, EPIDEMIOLOGIE DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT EN AFRIQUE DE L'OUEST. I. ENQUETE SEROLOGIQUE CHEZ LES RUMINANTS DOMESTIQUES AU BURKINA FASO, Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales 82 (1989) 321–331. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2766443/ (accessed August 10, 2022).
[17] J.P. Gonzalez, B. Le Guenno, M.J.R. Some, J.A. Akakpo, Serological evidence in sheep suggesting phlebovirus circulation in a rift valley fever enzootic area in Burkina Faso, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86 (1992) 680–682, https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90190-N.
[18] M. Guillaud, B. Le Guenno, M.L. Wilson, D. Desoutter, J.P. Gonzalez, J. P. Digoutte, Prévalence en anticorps contre le virus de la fièvre de la vallée du rift chez les petits ruminants du Sénégal, Ann. l'Institut Pasteur Virol. 139 (1988) 455–459, https://doi.org/10.1016/S0769-2617(88)80082-0.
[19] A.B. Ould El Mamy, M.O. Baba, Y. Barry, K. Isselmou, M.L. Dia, B. Hampate, M. Y. Diallo, M.O.B. El Kory, M. Diop, M.M. Lo, Y. Thiongane, M. Bengoumi, L. Puech, L. Plee, F. Claes, S. de la Rocque, B. Doumbia, Unexpected Rift Valley fever outbreak, northern Mauritania, Emerg. Infect. Dis. 17 (2011) 1894, https://doi.org/10.3201/EID1710.110397.
[20] O. Faye, H. Ba, Y. Ba, C.C.M. Freire, O. Faye, O. Ndiaye, I.O. Elgady, P.M. A. Zanotto, M. Diallo, A.A. Sall, Reemergence of rift valley fever, Mauritania, 2010, Emerg. Infect. Dis. 20 (2014) 300–303, https://doi.org/10.3201/eid2002.130996.

[21] B.M. Boushab, F.Z. Fall-Malick, S.E.W.O. Baba, M.L.O. Salem, M.R.D. Belizaire, H. Ledib, M.M.O.B. Ahmed, L.K. Basco, H. Ba, Severe human illness caused by rift valley fever virus in Mauritania, 2015, Open Forum Infect. Dis. 3 (2016), https://doi.org/10.1093/ofid/ofw200.

[22] Y. Barry, A. Elbara, M.A. Bollahi, A.B.O. El Mamy, M. Fall, A.D. Beyit, M. S. Khayar, B.A. Demba, M.L. Haki, O. Faye, L. Plee, E. Bonbon, B. Doumbia, E. Arsevska, C.B. Cêtre-Sossah, Rift Valley fever, Mauritania, 2020: lessons of a one health approach, SSRN Electron. J. 15 (2022), 100413, https://doi.org/10.2139/ssrn.4087383.

[23] S. Tabassum, F. Naeem, M. Azhar, A. Naeem, M.O. Oduoye, T. Dave, Rift Valley fever virus outbreak in Mauritania yet again in 2022: no room for complacency, Heal. Sci. Reports. 6 (2023), e1278, https://doi.org/10.1002/HSR2.1278.

[24] Y. Ba, A.A. Sall, D. Diallo, M. Mondo, L. Girault, I. Dia, M. Diallo, Re-emergence of Rift Valley fever virus in Barkedji (Senegal, West Africa) in 2002-2003: identification of new vectors and epidemiological implications, J. Am. Mosq. Control Assoc. 28 (2012) 170–178, https://doi.org/10.2987/12-5725.1.

[25] M. Diallo, L. Lochouarn, K. Ba, A.A. Sall, M. Mondo, L. Girault, C. Mathiot, First isolation of the Rift Valley fever virus from Culex poicilipes (Diptera: Culicidae) in nature, Am. J. Trop. Med. Hyg. 62 (2000) 702–704, https://doi.org/10.4269/AJTMH.2000.62.702.

[26] L. Marrama, A. Spiegel, K. Ndiaye, A.A. Sall, E. Gomes, M. Diallo, Y. Thiongane, C. Mathiot, J.P. Gonzalez, Domestic transmission of Rift Valley Fever virus in Diawara (Senegal) in 1998, Southeast Asian, J. Trop. Med. Public Health. 36 (2005) 1487–1495. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16610651/ (accessed January 26, 2023).

[27] V. Chevalier, R. Lancelot, Y. Thiongane, B. Sall, A. Diaité, B. Mondet, Rift Valley fever in small ruminants, Senegal, 2003, Emerg. Infect. Dis. 11 (2005) 1693, https://doi.org/10.3201/EID1111.050193.

[28] A. Sow, O. Faye, O. Faye, D. Diallo, B.D. Sadio, S.C. Weaver, M. Diallo, A.A. Sall, Rift Valley fever in Kedougou, southeastern Senegal, 2012, Emerg. Infect. Dis. 20 (2014) 504, https://doi.org/10.3201/EID2003.131174.

[29] J. Thonnon, M. Picquet, Y. Thiongane, M. Lo, R. Sylla, J. Vercruysse, Rift valley fever surveillance in the lower Senegal River basin: update 10 years after the epidemic, Trop. Med. Int. Heal. 4 (1999) 580–585, https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00437.x.

[30] A. Sow, O. Faye, Y. Ba, D. Diallo, G. Fall, O. Faye, N.S. Bob, C. Loucoubar, V. Richard, A.T. Dia, M. Diallo, D. Malvy, A.A. Sall, Widespread Rift Valley fever emergence in Senegal in 2013-2014, Open Forum Infect. Dis. 3 (2016), https://doi.org/10.1093/ofid/ofw149.

[31] World Health Organization, Rift Valley fever – Gambia, WHO, 2018. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/26-february-2018-rift-valley-fever-gambia-en (accessed May 30, 2023).

[32] M. Rissmann, F. Stoek, M.J. Pickin, M.H. Groschup, Mechanisms of inter-epidemic maintenance of Rift Valley fever phlebovirus, Antivir. Res. 174 (2020), https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104692.

[33] H. Boussini, C.E. Lamien, O.G. Nacoulma, A. Kaboré, G. Poda, G. Viljoen, Prevalence of Rift Valley fever in domestic ruminants in the central and northern regions of Burkina Faso, OIE Rev. Sci. Tech. 33 (2014) 893–901, https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2327.

[34] IZSAM, First Outbreaks of Rift Valley Fever in Nigeria. http://www.izs.it/IZS/First_outbreaks_of_Rift_Valley_Fever_in_Nigeria, 2017 (accessed November 29, 2022).

[35] C. Tong, E. Javelle, G. Grard, A. Dia, C. Lacrosse, T. Fourié, P. Gravier, S. Watier-Grillot, R. Lancelot, F. Letourneur, F. Comby, M. Grau, L. Cassou, J.B. Meynard, S. Briolant, I. Leparc-Goffart, V.P. de Santi, Tracking rift valley fever: from Mali to Europe and other countries, 2016, Eurosurveillance. 24 (2019) 1800213, https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800213.

[36] A. Lagare, G. Fall, A. Ibrahim, S. Ousmane, B. Sadio, M. Abdoulaye, A. Alhassane, A.E. Mahaman, B. Issaka, F. Sidikou, M. Zaneidou, B. Bienvenue, H. Djingarey Mamoudou, A. Bailo Diallo, G. Kadadé, J. Testa, H. Boubacar Mainassara, O. Faye, First occurrence of Rift Valley fever outbreak in Niger, 2016, Vet. Med. Sci. 5 (2019) 70–78, https://doi.org/10.1002/vms3.135.

[37] A.V. Opayele, G.N. Odaibo, O.D. Olaleye, Rift valley fever virus infection among livestock handlers in Ibadan, Nigeria, J. Immunoass. Immunochem. 39 (2018) 609–621, https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1525739.

[38] European Centre for Disease Prevention and Control, Annual Epidemiological Report for 2016. Mumps, Surveill. Rep. (2016) 1–7. https://ecdc.europa.eu/en/rift-valley-fever/facts (accessed May 30, 2023).

[39] I. Boiro, O.K. Konstaninov, A.D. Numerov, Isolation of Rift Valley fever virus from bats in the Republic of Guinea, Bull Soc Pathol Exot Fil. 80 (1987) 62–67. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3607999/ (accessed May 30, 2023).

[40] M. Diallo, P. Nabeth, K. Ba, A.A. Sall, Y. Ba, M. Mondo, L. Girault, M.O. Abdalahi, C. Mathiot, Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal, Med. Vet. Entomol. 19 (2005) 119–126, https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2005.00564.x.

[41] M.L. Wilson, L.E. Chapman, D.B. Hall, E.A. Dykstra, K. Ba, H.G. Zeller, M. Traore-Lamizana, J.P. Hervy, K.J. Linthicum, C.J. Peters, Rift Valley fever in rural northern Senegal: human risk factors and potential vectors, Am. J. Trop. Med. Hyg. 50 (1994) 663–675, https://doi.org/10.4269/AJTMH.1994.50.663.

[42] P. Nabeth, Y. Kane, M.O. Abdalahi, M. Diallo, K. Ndiaye, K. Ba, F. Schneegans, A. A. Sall, C. Mathiot, Rift Valley fever outbreak, Mauritania, 1998: Seroepidemiologic, virologic, entomologic, and zoologic investigations, Emerg. Infect. Dis. 7 (2001) 1052–1054, https://doi.org/10.3201/eid0706.010627.

[43] A. Sow, O. Faye, Y. Ba, H. Ba, D. Diallo, O. Faye, C. Loucoubar, M. Boushab, Y. Barry, M. Diallo, A.A. Sall, Rift Valley fever outbreak, southern Mauritania, 2012, Emerg. Infect. Dis. 20 (2014) 296, https://doi.org/10.3201/EID2002.131000.

[44] O. Faye, M. Diallo, D. Diop, O.E. Bezeid, H. Bâ, M. Niang, I. Dia, S.A.O. Mohamed, K. Ndiaye, D. Diallo, P.O. Ly, B. Diallo, P. Nabeth, F. Simon, B. Lô, O.M. Diop, Rift Valley fever outbreak with east-central African virus lineage in Mauritania, 2003, Emerg. Infect. Dis. 13 (2007) 1016, https://doi.org/10.3201/EID1307.061487.

[45] N.S. Bob, H. Bâ, G. Fall, E. Ishagh, M.Y. Diallo, A. Sow, P.M. Sembene, O. Faye, B. El Kouri, M.L. Sidi, A.A. Sall, Detection of the northeastern African Rift Valley fever virus lineage during the 2015 outbreak in Mauritania, Open Forum Infect. Dis. 4 (2017), https://doi.org/10.1093/ofid/ofx087.

[46] H.G. Zeller, A.J. Akakpo, M.M. Ba, Rift Valley fever epizootic in small ruminants in southern Mauritania (October 1993): risk of extensive outbreaks, Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920) 75 (1995) 135–140. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7487201/ (accessed May 30, 2023).

[47] CDC, Outbreak Summaries | Rift Valley Fever | Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2023. https://www.cdc.gov/vhf/rvf/outbreaks/summaries.html (accessed May 30, 2023).

[48] N. Cichon, Y. Barry, F. Stoek, A. Diambar, A. Ba, U. Ziegler, M. Rissmann, J. Schulz, M.L. Haki, D. Höper, B.A. Doumbia, M.Y. Bah, M.H. Groschup, M. Eiden, Co-circulation of Orthobunyaviruses and Rift Valley fever virus in Mauritania, 2015, Front. Microbiol. 12 (2021) 3524, https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766977.

[49] M. Bouloy, Molecular biology of Rift Valley fever virus, open, Virol. J. 4 (2010) 8–14, https://doi.org/10.2174/1874357901004010008.

[50] R. Flick, M. Bouloy, Rift Valley fever virus, Curr. Mol. Med. 5 (2005) 679–690, https://doi.org/10.2174/156652405774962263.

[51] H.G. Zeller, D. Fontenille, M. Traore-Lamizana, Y. Thiongane, J.P. Digoutte, Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal, Am. J. Trop. Med. Hyg. 56 (1997) 265–272, https://doi.org/10.4269/AJTMH.1997.56.265.

[52] S. Lumley, D.L. Horton, L.L.M. Hernandez-Triana, N. Johnson, A.R. Fooks, R. Hewson, Rift valley fever virus: strategies for maintenance, survival and vertical transmission in mosquitoes, J. Gen. Virol. 98 (2017) 875–887, https://doi.org/10.1099/jgv.0.000765.

[53] K.J. Linthicum, F.G. Davies, A. Kairo, C.L. Bailey, Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya, Epidemiol. Infect. 95 (1985) 197–209, https://doi.org/10.1017/S0022172400062434.

[54] C.A. Manore, B.R. Beechler, Inter-epidemic and between-season persistence of Rift Valley fever: vertical transmission or cryptic cycling? Transbound. Emerg. Dis. 62 (2015) 13–23, https://doi.org/10.1111/tbed.12082.

[55] R. Métras, L. Cavalerie, L. Dommergues, P. Mérot, W.J. Edmunds, M.J. Keeling, C. Cêtre-Sossah, E. Cardinale, The epidemiology of Rift Valley fever in Mayotte: insights and perspectives from 11 years of data, PLoS Negl. Trop. Dis. 10 (2016), e0004783, https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004783.

[56] E.H. Ndiaye, G. Fall, A. Gaye, N.S. Bob, C. Talla, C.T. Diagne, D. Diallo, Y. Ba, I. Dia, A. Kohl, A.A. Sall, M. Diallo, 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 (2016) 1–9, https://doi.org/10.1186/S13071-016-1383-Y/FIGURES/3.

[57] A. Alassane, I.I. Abdoulkarim, S.K. Bachir, H. Gagara, B. Ibrahima, Identification of the first cases of Peste des Petits ruminants and Rift Valley fever viruses in Koure ' s Giraffa camelopardalis peralta of Niger Republic, Sci. La Vie, La Terre Agron. 08 (2020) 130–133. http://publication.lecames.org/index.php/svt/article/view/1937 (accessed November 29, 2022).

[58] M.J. Oelofsen, E. Van Der Ryst, Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus? Onderstepoort J. Vet. Res. 66 (1999) 51–54. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10396763/ (accessed June 9, 2022).

[59] M.M. Olive, S.M. Goodman, J.M. Reynes, The role of wild mammals in the maintenance of Rift Valley fever virus, J. Wildl. Dis. 48 (2012) 241–266, https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.241.

[60] A. Evans, F. Gakuya, J.T. Paweska, M. Rostal, L. Akoolo, P.J. Van Vuren, T. Manyibe, J.M. Macharia, T.G. Ksiazek, D.R. Feikin, R.F. Breiman, M. Kariuki Njenga, Prevalence of antibodies against Rift Valley fever virus in Kenyan wildlife, Epidemiol. Infect. 136 (2008) 1261–1269, https://doi.org/10.1017/S0950268807009806.

[61] O.S. Saeed, A.H. El-Deeb, M.R. Gadalla, S.A.G. El-Soally, H.A.H. Ahmed, Genetic characterization of Rift Valley fever virus in insectivorous bats, Egypt, Vector-Borne Zoonotic Dis. 21 (2021) 1003–1006, https://doi.org/10.1089/vbz.2021.0054.

[62] A. Hartman, Rift Valley Fever, Clin. Lab. Med. 37 (2017) 285, https://doi.org/10.1016/J.CLL.2017.01.004.

[63] M. Booth, Climate change and the neglected tropical diseases, in: Adv. Parasitol, Academic Press, 2018, pp. 39–126, https://doi.org/10.1016/bs.apar.2018.02.001.

[64] J.T. Paweska, Rift Valley Fever, in: Emerg. Infect. Dis. Clin. Case Stud, 2014, pp. 73–93, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416975-3.00006-6.

[65] A. Apolloni, G. Nicolas, C. Coste, A.B. El Mamy, B. Yahya, A.S. El Arbi, M. B. Gueya, D. Baba, M. Gilbert, R. Lancelot, Towards the description of livestock mobility in Sahelian Africa: Some results from a survey in Mauritania, PLoS One 13 (2018), e0191565, https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0191565.

[66] B. Mondet, A. Diaïté, A.G. Fall, V. Chevalier, Relations entre la pluviométrie et le risque de transmission virale par les moustiques: Cas du virus de la Rift Valley Fever (RVF) dans le Ferlo (Sénégal), in: Environnement, Risques et Sante, 2005, pp. 125–129.

[67] D. Wright, J. Kortekaas, T.A. Bowden, G.M. Warimwe, Rift valley fever: biology and epidemiology, J. Gen. Virol. 100 (2019) 1187–1199, https://doi.org/10.1099/jgv.0.001296.
[68] P.J. Wichgers Schreur, L. Van Keulen, J. Kant, N. Oreshkova, R.J.M. Moormann, J. Kortekaas, Co-housing of Rift Valley fever virus infected lambs with immunocompetent or immunosuppressed lambs does not result in virus transmission, Front. Microbiol. 7 (2016), https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00287.
[69] I.Z. Iman, R. El-Karamany, S. Kasem, Studies on goats experimentally infected with R.V.F. virus, J. Egypt. Public Health Assoc. 53 (1978) 273–280. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/752709/ (accessed November 29, 2022).
[70] J. Oymans, P.J. Wichgers Schreur, L. van Keulen, J. Kant, J. Kortekaas, Rift valley fever virus targets the maternal-foetal interface in ovine and human placentas, PLoS Negl. Trop. Dis. 14 (2020) 1–18, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007898.
[71] L. Odendaal, A.S. Davis, G.T. Fosgate, S.J. Clift, Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley fever virus infection in young lambs, Vet. Pathol. 57 (2020) 66–81, https://doi.org/10.1177/0300985819882633.
[72] A.F.G. Antonis, J. Kortekaas, J. Kant, R.P.M. Vloet, A. Vogel-Brink, N. Stockhofe, R.J.M. Moormann, Vertical transmission of rift valley fever virus without detectable maternal viremia, Vector-Borne Zoonotic Dis. 13 (2013) 601–606, https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1160.
[73] C.M. McMillen, N. Arora, D.A. Boyles, J.R. Albe, M.R. Kujawa, J.F. Bonadio, C. B. Coyne, A.L. Hartman, Rift Valley fever virus induces fetal demise in Sprague-Dawley rats through direct placental infection, Sci. Adv. 4 (2018), https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9812.
[74] V. Msimang, P.N. Thompson, P.J. van Vuren, S. Tempia, C. Cordel, J. Kgaladi, J. Khosa, F.J. Burt, J. Liang, M.K. Rostal, W.B. Karesh, J.T. Paweska, Rift valley fever virus exposure amongst farmers, farm workers, and veterinary professionals in Central South Africa, Viruses. 11 (2019) 140, https://doi.org/10.3390/v11020140.
[75] D.E. Nicholas, K.H. Jacobsen, N.M. Waters, Risk factors associated with human Rift Valley fever infection: systematic review and meta-analysis, Trop. Med. Int. Heal. 19 (2014) 1420–1429, https://doi.org/10.1111/tmi.12385.
[76] H.M. Arishi, A.Y. Aqeel, M.M. Al Hazmi, Vertical transmission of fatal Rift Valley fever in a newborn, Ann. Trop. Paediatr. 26 (2006) 251–253, https://doi.org/10.1179/146532806X120363.
[77] I. Adam, M.S. Karsany, Case report: rift valley fever with vertical transmission in a pregnant Sudanese woman, J. Med. Virol. 80 (2008) 929, https://doi.org/10.1002/jmv.21132.
[78] C.M. McMillen, A.L. Hartman, Rift Valley fever: a threat to pregnant women hiding in plain sight? J. Virol. 95 (2021) https://doi.org/10.1128/jvi.01394-19.
[79] G.H. Gerdes, Rift Valley fever, OIE Rev. Sci. Tech. 23 (2004) 613–623, https://doi.org/10.20506/rst.23.2.1500.
[80] W.C. Wilson, I.J. Kim, J.D. Trujillo, S.Y. Sunwoo, L.E. Noronha, K. Urbaniak, D. S. McVey, B.S. Drolet, I. Morozov, B. Faburay, E.E. Schirtzinger, T. Koopman, S. V. Indran, V. Balaraman, J.A. Richt, Susceptibility of white-tailed deer to rift valley fever virus, Emerg. Infect. Dis. 24 (2018) 1717–1719, https://doi.org/10.3201/eid2409.180265.
[81] L. Odendaal, A.S. Davis, G.T. Fosgate, S.J. Clift, Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley fever virus infection in young lambs, Vet. Pathol. 57 (2020) 66–81, https://doi.org/10.1177/0300985819882633.
[82] L. Odendaal, S.J. Clift, G.T. Fosgate, A.S. Davis, Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley fever virus infection in adult sheep, Vet. Pathol. 56 (2019) 61–77, https://doi.org/10.1177/0300985818806049.
[83] J.A. Coetzer, The pathology of Rift Valley fever. II. Lesions occurring in field cases in adult cattle, calves and aborted foetuses, Onderstepoort J. Vet. Res. 49 (1982) 11–17. https://repository.up.ac.za/handle/2263/51108 (accessed May 3, 2022).
[84] J.A. Coetzer, The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs, Onderstepoort J. Vet. Res. 44 (1977) 205–211. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/613292/ (accessed June 22, 2022).
[85] J.T. Paweska, P. Jansen van Vuren, Rift Valley fever virus: a virus with potential for global emergence, in: Role Anim. Emerg. Viral Dis, Academic Press, 2013, pp. 169–200, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405191-1.00008-9.
[86] B.C. Easterday, M.H. Mcgavran, J.R. Rooney, L.C. Murphy, The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs, Am. J. Vet. Res. 23 (1962) 470–479.
[87] W.C. Wilson, A.S. Davis, N.N. Gaudreault, B. Faburay, J.D. Trujillo, V. Shivanna, S.Y. Sunwoo, A. Balogh, A. Endalew, W. Ma, B.S. Drolet, M.G. Ruder, I. Morozov, D.S. McVey, J.A. Richt, Experimental infection of calves by two genetically-distinct strains of rift valley fever virus, Viruses. 8 (2016), https://doi.org/10.3390/v8050145.
[88] L. Odendaal, S.J. Clift, G.T. Fosgate, A.S. Davis, Ovine fetal and placental lesions and cellular tropism in natural Rift Valley fever virus infections, Vet. Pathol. 57 (2020) 791–806, https://doi.org/10.1177/0300985820954549.
[89] J. Oymans, P.J. Wichgers Schreur, L. van Keulen, J. Kant, J. Kortekaas, Rift valley fever virus targets the maternal-foetal interface in ovine and human placentas, PLoS Negl. Trop. Dis. 14 (2020) 1–18, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007898.
[90] B.R. Beechler, R. Bengis, R. Swanepoel, J.T. Paweska, A. Kemp, P.J. van Vuren, J. Joubert, V.O. Ezenwa, A.E. Jolles, Rift valley fever in Kruger national park: do buffalo play a role in the inter-epidemic circulation of virus? Transbound. Emerg. Dis. 62 (2015) 24–32, https://doi.org/10.1111/tbed.12197.
[91] A. Nafady, A.H. Bayoumi, M.A. El-Zaher, M.S. Youssef, Rift VALLE fever : pathological changes on the suspected BUFALOE calves and aborted FOETUSES, Assiut Vet. Med. J. 14 (2) (1985) 93–100, https://doi.org/10.21608/AVMJ.1985.190204.
[92] T. Ikegami, S. Makino, The pathogenesis of rift valley fever, Viruses. 3 (2011) 493–519, https://doi.org/10.3390/v3050493.
[93] M. Mohamed, F. Mosha, J. Mghamba, S.R. Zaki, W.J. Shieh, J. Paweska, S. Omulo, S. Gikundi, P. Mmbuji, P. Bloland, N. Zeidner, R. Kalinga, R.F. Breiman, M.K. Njenga, Epidemiologic and clinical aspects of a Rift Valley fever outbreak in humans in Tanzania, 2007, Am. J. Trop. Med. Hyg. 83 (2010) 22–27, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0318.
[94] T.A. Madani, Y.Y. Al-Mazrou, M.H. Al-Jeffri, A.A. Mishkhas, A.M. Al-Rabeah, A. M. Turkistani, M.O. Al-Sayed, A.A. Abodahish, A.S. Khan, T.G. Ksiazek, O. Shobokshi, Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics, Clin. Infect. Dis. 37 (2003) 1084–1092, https://doi.org/10.1086/378747.
[95] E. Javelle, A. Lesueur, V. Pommier De Santi, F. De Laval, T. Lefebvre, G. Holweck, G.A. Durand, I. Leparc-Goffart, G. Texier, F. Simon, The challenging management of Rift Valley fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal, Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 19 (2020), https://doi.org/10.1186/s12941-020-0346-5.
[96] D.R. Smith, K.E. Steele, J. Shamblin, A. Honko, J. Johnson, C. Reed, M. Kennedy, J.L. Chapman, L.E. Hensley, The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model, Virology. 407 (2010) 256–267, https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.08.016.
[97] J.T. Paweska, Rift Valley fever, OIE Rev. Sci. Tech. 34 (2015) 375–389, https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2364.
[98] S.S. Kahlon, C.J. Peter, J. LeDuc, E.M. Muchiri, S. Muiruri, M.K. Njenga, R. F. Breiman, A.C. White, C.H. King, Severe rift valley fever may present with a characteristic clinical syndrome, Am. J. Trop. Med. Hyg. 82 (2010) 371–375, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0669.
[99] T. Ikegami, S. Makino, The pathogenesis of Rift Valley fever, Viruses. 3 (2011) 493, https://doi.org/10.3390/V3050493.
[100] O. Riou, B. Philippe, A. Jouan, I. Coulibaly, M. Mondo, J.P. Digoutte, Neurologic and Neurosensory Forms of Rift Valley Fever in Mauritania. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2633869/, 1989 (accessed June 20, 2022).
[101] Z. Anywaineid, S.A. Luleid, C. Hansenid, G. Warimwe, A. Elliottid, Clinical manifestations of Rift Valley fever in humans: systematic review and meta-analysis, PLoS Negl. Trop. Dis. 16 (2022), e0010233, https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010233.
[102] M. El Imam, M. El Sabiq, M. Omran, A. Abdalkareem, M.A. El Gaili Mohamed, A. Elbashir, O. Khalafala, Acute renal failure associated with the Rift Valley fever: a single center study, Saudi J. Kidney Dis. Transpl. 20 (2009) 1047–1052. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19861868/ (accessed June 21, 2022).
[103] B.M. Boushab, F.Z. Fall-Malick, S.E.W.O. Baba, M.L.O. Salem, M.R.D. Belizaire, H. Ledib, M.M.O.B. Ahmed, L.K. Basco, H. Ba, Severe human illness caused by rift valley fever virus in Mauritania, 2015, Open Forum Infect. Dis. 3 (2016), https://doi.org/10.1093/ofid/ofw200.
[104] A.H. Turkistany, A.G. Mohamed, N. Al-Hamdan, SEROPREVALENCE OF RIFT VALLEY FEVER AMONG SLAUGHTERHOUSE PERSONNEL IN MAKKAH DURING HAJJ 1419h (1999), J. Family Community Med. 8 (2001) 53 (accessed April 13, 2022).
[105] E.S. Swai, L. Schoonman, Prevalence of rift valley fever immunoglobulin g antibody in various occupational groups before the 2007 outbreak in Tanzania, Vector-Borne Zoonotic Dis. 9 (2009) 579–582, https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0108.
[106] B.N. Archer, J. Weyer, J. Paweska, D. Nkosi, P. Leman, K.S. Tint, L. Blumberg, Outbreak of Rift Valley fever affecting veterinarians and farmers in South Africa, 2008, South African, Med. J. 101 (2011) 263–266, https://doi.org/10.7196/samj.4544.
[107] B.H. Bird, T.G. Ksiazek, S.T. Nichol, N.J. MacLachlan, Rift Valley fever virus, J. Am. Vet. Med. Assoc. 234 (2009) 883–893, https://doi.org/10.2460/javma.234.7.883.
[108] C.M. McMillen, A.L. Hartman, Rift Valley fever in animals and humans: current perspectives, Antivir. Res. 156 (2018) 29–37, https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.05.009.
[109] O.D. Olaleye, O. Tomori, M.A. Ladipo, H. Schmitz, Rift Valley fever in Nigeria: infections in humans, Rev. Sci. Tech. 15 (1996) 923–935, https://doi.org/10.20506/rst.15.3.967.
[110] R. Métras, W. John Edmunds, C. Youssouffi, L. Dommergues, G. Fournié, A. Camacho, S. Funk, E. Cardinale, G. Le Godais, S. Combo, L. Filleul, H. Youssouf, M. Subiros, Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117 (2020) 24567–24574, https://doi.org/10.1073/pnas.2004468117.
[111] C. Sindato, E. Karimuribo, L.E.G. Mboera, The epidemiology and socio-economic impact of Rift Valley fever in Tanzania: a review, Tanzan, J. Health Res. 13 (2011) 1–16, https://doi.org/10.4314/thrb.v13i5.1.
[112] S.S. Shabani, M.J. Ezekiel, M. Mohamed, C.S. Moshiro, Knowledge, attitudes and practices on Rift Valley fever among agro pastoral communities in Kongwa and Kilombero districts, Tanzania, BMC Infect. Dis. 15 (2015) 1–9, https://doi.org/10.1186/s12879-015-1099-1.
[113] R. Osabohien, O. Matthew, O. Gershon, T. Ogunbiyi, E. Nwosu, Agriculture development, employment generation and poverty reduction in West Africa, open, Agric. J. 13 (2019) 82–89, https://doi.org/10.2174/1874331501913010082.
[114] B.M. Boushab, M. Savadogo, S.M. Sow, S. Soufiane, Enquête d'investigation sur des cas de fièvre de la vallée du Rift au Tagant, Mauritanie, Rev. Epidemiol. Sante Publique 63 (2015) 213–216, https://doi.org/10.1016/J.RESPE.2015.03.124.
[115] M. Peyre, V. Chevalier, S. Abdo-Salem, A. Velthuis, N. Antoine-Moussiaux, E. Thiry, F. Roger, A systematic scoping study of the socio-economic impact of

Rift Valley fever: research gaps and needs, Zoonoses Public Health 62 (2015) 309–325, https://doi.org/10.1111/ZPH.12153.
[116] O.A. Hassan, C. Ahlm, M. Evander, A need for one health approach – lessons learned from outbreaks of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Sudan, Infect. Ecol. Epidemiol. 4 (2014) 20710, https://doi.org/10.3402/iee.v4.20710.
[117] M. Kasye, D. Teshome, A. Abiye, A. Eshetu, Austin Virology and Retro Virology A Review on Rift Valley Fever on Animal, Human Health and its Impact on Live Stock Marketing, Austin Virol. Retro Virol. 3 (2016) 1–8.
[118] K.M. Rich, F. Wanyoike, An assessment of the regional and national socio-economic impacts of the 2007 Rift Valley fever outbreak in Kenya, Am. J. Trop. Med. Hyg. 83 (2010) 52–57, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0291.
[119] C.M. Nganga, S.A. Bukachi, B.K. Bett, Lay perceptions of risk factors for Rift Valley fever in a pastoral community in northeastern Kenya, BMC Public Health 16 (2016) 1–10, https://doi.org/10.1186/s12889-016-2707-8.
[120] C.C. Jost, S. Nzietchueng, S. Kihu, B. Bett, G. Njogu, E.S. Swai, J.C. Mariner, Epidemiological assessment of the Rift Valley fever outbreak in Kenya and Tanzania in 2006 and 2007, Am. J. Trop. Med. Hyg. 83 (2010) 66–72, https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0290.
[121] A.A. Chengula, R.H. Mdegela, C.J. Kasanga, Socio-economic impact of Rift Valley fever to pastoralists and agro pastoralists in Arusha, Manyara and Morogoro regions in Tanzania, Springerplus. 2 (2013) 1–14, https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-549.
[122] E. Omosa, B. Bett, B. Kiage, Climate change and Rift Valley fever disease outbreak: implications for the food environment of pastoralists, Lancet. Planet. Heal. 6 (2022) S17, https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00279-0.
[123] S.S. Nielsen, J. Alvarez, D.J. Bicout, P. Calistri, K. Depner, J.A. Drewe, B. Garin-Bastuji, J.L. Gonzales Rojas, C.G. Schmidt, V. Michel, M.A. Miranda Chueca, H. C. Roberts, L.H. Sihvonen, K. Stahl, A. Velarde, A. Trop, C. Winckler, C. Cetre-Sossah, V. Chevalier, C. de Vos, S. Gubbins, S.E. Antoniou, A. Broglia, S. Dhollander, Van der Stede, rift valley fever: risk of persistence, spread and impact in Mayotte (France), EFSA J. 18 (2020) 1–61, https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6093.
[124] J.D. Ahrens, Cessation of Livestock Exports Severely Affects the Pastoralist Economy of Somali Region. Mission 31 March to 7 April 1998. https://reliefweb.int/report/ethiopia/cessation-livestock-exports-severely-affects-pastoralist-economy-somali-region, 1998 (accessed May 31, 2023).
[125] USAID, East Africa Regional Food Security Update: Rapid assessment of Garissa livestock market. www.fews.net, 2008 (accessed May 31, 2023).
[126] M. Handlos, Assessment of the Estimated Costs of Past Disease Outbreaks in Yemen, Rainfed Agriculture and Livestock Project: International Expertise Service for the General Directorate of Animal Resources, Yemen, Sana'a and Vientiane, Yemen, IDA CR. No. 4220 YEM. https://fews.net/sites/default/files/documents/reports/East_200612en.pdf, 2009.
[127] World oOrganisation for aAnimal hHealth (WOAH), Infection with rift valley fever virus, terrestrial animal health code - 15/08/2022, chapter 8.15.9 and 8.15.10, 2022. https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/codes-et-manuels/acces-en-ligne-au-code-terrestre/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_rvf.htm.
[128] A.B. Orinde, T. Kimani, E. Schelling, J. Omolo, G.M. Kikuvi, et al., Estimation of the rift valley fever burden of disease in the 2006/2007 outbreak in Kenya, Am. J. Trop. Med. Hyg. 87 (2012) 81. https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/27755 (accessed May 31, 2023).
[129] C.M. Mburu, S.A. Bukachi, B. Bett, Pastoralists' perceptions on the impact of rift valley fever disease following an outbreak in north eastern Kenya, Pastoralism. 12 (2022), https://doi.org/10.1186/s13570-022-00239-3.
[130] B. Molina-flores, P. Manzano-baena, M.D. Coulibaly, B. Bedane, The Role of Livestock in Food Security, Poverty Reduction and Wealth Creation in West Africa, 2020, https://doi.org/10.4060/ca8385en.
[131] M.J.B. Kamuanga, J. Somda, Y. Sanon, H. Kagoné, SWAC-OECD/ECOWAS, Livestock and regional market in the Sahel and West Africa Potentials and challenges, OECD, 2008. http://www.oecd.org/swac/publications/41848366.pdf.
[132] M.J.B. Kamuanga, J. Somda, Y. Sanon, H. Kagoné, SWAC-OECD/ECOWAS, Livestock and regional market in the Sahel and West Africa Potentials and challenges. www.oecd.org/swac, 2008 accessed May 31, 2023.
[133] O.A. Hassan, C. Ahlm, M. Evander, A need for one health approach – lessons learned from outbreaks of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Sudan, Infect. Ecol. Epidemiol. 4 (2014) 20710, https://doi.org/10.3402/iee.v4.20710.
[134] B.H. Bird, A.K. McElroy, Rift Valley fever virus: unanswered questions, Antivir. Res. 132 (2016) 274–280, https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.005.
[135] R. Métras, W. John Edmunds, C. Youssouffi, L. Dommergues, G. Fournié, A. Camacho, S. Funk, E. Cardinale, G. Le Godais, S. Combo, L. Filleul, H. Youssouf, M. Subiros, Estimation of Rift Valley fever virus spillover to humans during the Mayotte 2018-2019 epidemic, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 117 (2020) 24567–24574, https://doi.org/10.1073/pnas.2004468117.
[136] J. Charlier, H.W. Barkema, P. Becher, P. De Benedictis, I. Hansson, I. Hennig-Pauka, R. La Ragione, L.E. Larsen, E. Madoroba, D. Maes, C.M. Marín, F. Mutinelli, A.J. Nisbet, K. Podgórska, J. Vercruysse, F. Vitale, D.J.L. Williams, R. N. Zadoks, Disease control tools to secure animal and public health in a densely populated world, Lancet Planet. Heal. 6 (2022) e812–e824, https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00147-4.
[137] WHO, Rift Valley Fever – Mauritania. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/rift-valley-fever-mauritania, 2020 accessed August 21, 2022.
[138] B. Faburay, A.D. LaBeaud, D.S. McVey, W.C. Wilson, J.A. Richt, Current status of rift valley fever vaccine development, Vaccines. 5 (2017) 29, https://doi.org/10.3390/vaccines5030029.
[139] B. Dungu, B.A. Lubisi, T. Ikegami, Rift Valley fever vaccines: current and future needs, Curr. Opin. Virol. 29 (2018) 8–15, https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2018.02.001.
[140] E.N. Grossi-Soyster, A.D. LaBeaud, Rift valley fever: important considerations for risk mitigation and future outbreaks, Trop. Med. Infect. Dis. 5 (2020), https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020089.
[141] World Organization for Animal Health, Rift Valley Fever - WOAH - Africa. https://rr-africa.woah.org/en/projects/gf-tads-for-africa/rift-valley-fever/, 2023 accessed May 31, 2023.
[142] Y.M. Tourre, J.P. Lacaux, C. Vignolles, M. Lafaye, Climate impacts on environmental risks evaluated from space: a conceptual approach to the case of rift valley fever in Senegal, Glob. Health Action 2 (2009), https://doi.org/10.3402/gha.v2i0.2053.
[143] R. Métras, L. Cavalerie, L. Dommergues, P. Mérot, W.J. Edmunds, M.J. Keeling, C. Cêtre-Sossah, E. Cardinale, The epidemiology of Rift Valley fever in Mayotte: insights and perspectives from 11 years of data, PLoS Negl. Trop. Dis. 10 (2016), https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004783.
[144] S. Kalthoum, E. Arsevska, K. Guesmi, A. Mamlouk, J. Cherni, M. Lachtar, R. Gharbi, B.B.H. Mohamed, W. Khalfaoui, A. Dhaouadi, M.N. Baccar, H. Hajlaoui, S. Mzoughi, C. Seghaier, L. Messadi, M. Zrelli, S. Sghaier, C. Cêtre-Sossah, P. Hendrikx, C. Squarzoni-Diaw, Risk based serological survey of Rift Valley fever in Tunisia (2017–2018), Heliyon. 7 (2021), https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07932.
[145] G.O. Muga, W. Onyango-Ouma, R. Sang, H. Affognon, Review article: sociocultural and economic dimensions of Rift Valley fever, Am. J. Trop. Med. Hyg. 92 (2015) 730–738, https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0363.
[146] D. Taylor, M. Hagenlocher, A.E. Jones, S. Kienberger, J. Leedale, A.P. Morse, Environmental change and rift valley fever in eastern Africa: projecting beyond healthy futures, Geospat, Health. 11 (2016) 115–128, https://doi.org/10.4081/gh.2016.387.
[147] Y. Barry, A. Elbara, M.A. Bollahi, A.B.O. El Mamy, M. Fall, A.D. Beyit, M. S. Khayar, B.A. Demba, M.L. Haki, O. Faye, L. Plee, E. Bonbon, B. Doumbia, E. Arsevska, C. Cêtre-Sossah, Rift Valley fever, Mauritania, 2020: Lessons from a one health approach, One Heal. 15 (2022) 1–9, https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100413.
[148] R. Métras, G. Fournié, L. Dommergues, A. Camacho, L. Cavalerie, P. Mérot, M. J. Keeling, C. Cêtre-Sossah, E. Cardinale, W.J. Edmunds, Drivers for Rift Valley fever emergence in Mayotte: a Bayesian modelling approach, PLoS Negl. Trop. Dis. 11 (2017), https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005767.
[149] D.L. Pendell, J.L. Lusk, T.L. Marsh, K.H. Coble, S.C. Szmania, Economic assessment of zoonotic diseases: an illustrative study of Rift Valley fever in the United States, Transbound. Emerg. Dis. 63 (2016) 203–214, https://doi.org/10.1111/tbed.12246.
[150] A. de Vos, G.S. Cumming, D.H.M. Cumming, J.M. Ament, J. Baum, H.S. Clements, J.D. Grewar, K. Maciejewski, C. Moore, Pathogens, disease, and the social-ecological resilience of protected areas, Ecol. Soc. 21 (2016), https://doi.org/10.5751/ES-07984-210120.
[151] Food and Agriculture Organization of trhe United Nation, La FAO appuie les pays d'Afrique de l'Ouest à élaborer une stratégie régionale pour la prévention et le contrôle de la fièvre de la Vallée du Rift | FAO au Sénégal, Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2018. https://www.fao.org/senegal/actualites/detail-events/en/c/1169878/ (accessed May 31, 2023).
[152] World Health Organization, Rift Valley Fever, WHO, 2018. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever (accessed May 31, 2023).

Annexe 3 : Données supplémentaires de l'article 1 "Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes"

Table 1: List of antibodies and reagents used in this study

Target or product	Primary labeling antibody	Dilution or concentration (Reference)	Secondary labeling antibody	Dilution (Reference)
RVFV N structural protein	Monoclonal mouse IgG1 anti-N RVFV	1:50 (Cirad, 15G6-4B8)	Polyclonal donkey IgG anti-mouse IgG 555	1:500 (Invitrogen A31570)
Astrocyte GFAP	Polyclonal goat IgG anti-GFAP	1:100 (Abcam ab53554)	Polyclonal rabbit Ig anti-goat Ig 488	1:50 (DAKO, F0250)
RVFV NSs protein	Polyclonal mouse Ig anti-NSs	1:200 (Yadani et al., 1999)	Polyclonal donkey IgG anti-rabbit IgG 488	1:500 (Invitrogen A32790)
Cleaved-caspase 3	Polyclonal rabbit IgG anti-cleaved Caspase 3	1:50 (Merck, AB3623)	Polyclonal donkey IgG anti-rabbit IgG 488	1:500 (Invitrogen A32790)
Cleaved-caspase 3	Polyclonal rabbit IgG anti-cleaved Caspase 3	1:200 (Cell Signaling, 9661)	Polyclonal donkey IgG anti-rabbit IgG 488	1:500 (Invitrogen A32790)
Nucleus			DAPI	1:1000 (Sigma-Aldrich, MBD0015)
Phosphate-buffered saline (PBS)		1X (Sigma-Aldrich, D8537)		
Triton 100X		0.1% (Sigma-Aldrich, 93443)		
Paraformaldehyde (PFA)		4% (Sigma-Aldrich, P6148)		
Bovine serum albumin (BSA)		2% (Sigma-Aldrich, A7906)		
H_2O_2		25mM (Sigma-Aldrich, H1009)		

Table 2: List of genes analyzed with the RT² Human Antiviral Response kit (QIAGEN, USA)

Gene	Description	Gene	Description	Gene	Description
AIM2	Absent In Melanoma 2	*IFNA2*	Interferon, alpha 2	*NFKBIA*	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor, alpha
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G	*IFNAR1*	Interferon (alpha, beta and omega) Receptor 1	*NLRP3*	NLR family, pyrin domain containing 3
ATG5	Autophagy Related 5	*IFNB1*	Interferon, beta 1	*NOD2*	Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 2
AZI2	5-Azacytidine Induced 2	*IKBKB*	Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, Kinase Beta	*OAS2*	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 2, 69/71kDa
CARD9	Caspase Recruitment Domain family, member 9	*IL12A*	Interleukin 12A	*PIN1*	Peptidylprolyl cis/trans Isomerase, NIMA-interacting 1
CASP1	Caspase 1	*IL12B*	Interleukin 12B	*PSTPIP1*	Proline-Serine-Threonine Phosphatase Interacting Protein 1
CASP10	Caspase 10	*IL15*	Interleukin 15	*PYCARD*	PYD and CARD domain containing
CASP8	Caspase 8	*IL18*	Interleukin 18	*PYDC1*	PYD (PYrin Domain) Containing 1
CCL3	Chemokine (C-C motif) Ligand 3	*IL1B*	Interleukin 1, beta	*RELA*	V-rel Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
CCL5	Chemokine (C-C motif) Ligand 5	*IL6*	Interleukin 6	*RIPK1*	Receptor (TNFRSF)-Interacting serine-threonine Kinase 1
CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	*IL8*	Interleukin 8	*SPP1*	Secreted PhosphoProtein 1
CD80	CD80 molecule	*IRAK1*	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1	*STAT1*	Signal Transducer and Activator of Transcription 1, 91kDa
CD86	CD86 molecule	*IRF3*	Interferon Regulatory Factor 3	*SUGT1*	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (*S. cerevisiae*)
CHUK	Conserved Helix-loop-helix Ubiquitous Kinase	*IRF5*	Interferon Regulatory Factor 5	*TBK1*	TANK-Binding Kinase 1
CTSB	Cathepsin B	*IRF7*	Interferon Regulatory Factor 7	*TICAM1*	Toll-like receptor Adaptor Molecule 1
CTSL	Cathepsin L1	*ISG15*	Interferon Stimulated Gene 15	*TLR3*	Toll-Like Receptor 3
CTSS	Cathepsin S	*JUN*	Jun proto-oncogene	*TLR7*	Toll-Like Receptor 7
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10	*MAP2K1*	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1	*TLR8*	Toll-Like Receptor 8
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 11	*MAP2K3*	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3	*TLR9*	Toll-Like Receptor 9
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 9	*MAP3K1*	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1	*TNF*	Tumor Necrosis Factor
CYLD	Cylindromatosis (turban tumor syndrome)	*MAP3K7*	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7	*TRADD*	TNFRSF1A-Associated via Death Domain
TKFC	Dihydroxyacetone kinase 2	*MAPK1*	Mitogen-Activated Protein Kinase 1	*TRAF3*	TNF Receptor-Associated Factor 3
DDX3X	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	*MAPK14*	Mitogen-Activated Protein Kinase 14	*TRAF6*	TNF Receptor-Associated Factor 6
DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	*MAPK3*	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	*TRIM25*	Tripartite Motif containing 25
DHX58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	*MAPK8*	Mitogen-Activated Protein Kinase 8	*ACTB*	Actin, beta
FADD	Fas (TNFRSF6)-Associated via Death Domain	*MAVS*	Mitochondrial Antiviral Signaling protein	*B2M*	Beta-2-Microglobulin
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	*MEFV*	Mediterranean Fever	*GAPDH*	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90kDa Alpha (cytosolic), class A member 1	*MX1*	Myxovirus (influenza virus) resistance 1	*HPRT1*	Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase 1

IFIH1	Interferon Induced with Helicase C domain 1	*MYD88*	Myeloid Differentiation primary response gene (88)	*RPLP0*	Ribosomal Protein, Large, P0
IFNA1	Interferon, alpha 1	*NFKB1*	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1		

Table 3: List of proteins analyzed using the LEGENDPlex kits (BioLegend, USA)

*Not detected due to concentration under limit of detection in all tested conditions and/or not included in the RT² gene panel.

Bead ID	**Human Proinflammatory Chemokines Panel 1** No. 740985		**Human Neuroinflammation Panel 1** No. 740796		**Human Anti-Virus Response Panel** No. 740390	
	Protein	Description	Protein	Description	Protein	Description
A4	IL-8	Interleukin 8	VILIP-1	Serum Visinin-Like Protein 1	IL-1β	Interleukin 1 beta
A5	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10	CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2	IL-6	Interleukin 6
A6	CCL11/24/ 26*	Chemokine (C-C motif) Ligand 11/24/26	sTREM-2	soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-2	TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
A7	CCL17*	Chemokine (C-C motif) Ligand 17	BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 10
A8	CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2	TGF-β1 (Free Active)	Transforming Growth Factor beta 1	IFN-λ1*	Interferon lambda 1
A10	CCL5	Chemokine (C-C motif) Ligand 5	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	IL-8	Interleukin 8
B2	CCL3	Chemokine (C-C motif) Ligand 3	IL-6	Interleukin 6	IL12a/IL12b	Interleukin 12 (S.U. A and B)
B3	CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 9	sTREM-1	soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1	IFN-α2	Interferon alpha 2
B4	CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5	β-NGF	beta Nerve Growth Factor	IFN-λ2/3*	Interferon lambda 2 and 3
B5	CCL20	Chemokine (C-C motif) Ligand 20	IL-18	Interleukin 18	GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor
B6	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1	TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha	IFN-β1	Interferon beta 1
B7	CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 11	sRAGE	soluble Receptor for Advanced Glycation End products	IL-10*	Interleukin 10
B9	CCL4*	Chemokine (C-C motif) Ligand 4	CX3CL1 *	Chemokine (C-X3-C motif) Ligand 1	IFN-γ	Interferon gamma

Table 4: List of primers and RTqPCR cycling conditions.

Target gene	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'-3'	Reference
BDNF	GGATGAGGACCAGAAAGT	AGCAGAAAGAGAAGAGGAG	[1]
NGF	CCATCCCATCTTCCACAG	CTCTCCCAACACCATCAC	[1]
CCL5	CTCATTGCTACTGCCCTCTGCGCTCCTGC	GCTCATCTCCAAAGAGTTGATGTACTC	[2]
CXCL10	TATTCCTGCAAGCCAATTTTGTC	TCTTGATC*GCCTTCGATTCTG	[3]
CXCL11	GACGCTGTCTTTGCATAGGC	GGATTTAGGCATCGTTGTCCTTT	[4]
HPRT1	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC	[5]
IFNB1	GTCTCCTCCAAATTGCTCTC	ACAGGAGCTTCTGACACTGA	[6]
IL1B	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	[7]
IL6	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC	CCCAGGGAGAAGGCAACTG	[8]
TNF	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	[9]
VEGF	TGCAGATTATGCGGATCAAACC	TGCATTCACATTTGTTGTGCTGTAG	[10]

RTqPCR cycling conditions

Kit	Cycling conditions						
	Preincubation	cDNA synthesis	Amplification			Melting curve/Inactivation	
RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fischer Scientific, USA)	65°C, 5min	42°C, 60min				70°C, 5min	
LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Switzerland)	95°C, 10min		95°C, 15s	60°C, 15s	72°C, 25s	95°C, 5s	65°C to 97°C continuously

*G instead of C in the reference [3]

[1] Esmaeili A, Alifarja S, Nourbakhsh N, et al. Messenger RNA expression patterns of neurotrophins during transdifferentiation of stem cells from human-exfoliated deciduous teeth into neural-like cells. Avicenna J Med Biotechnol. 2014;6:21–26.

[2] Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, et al. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. Prostate. 2006;66:124–134.

[3] Eichholz K, Mennechet FJD, Kremer EJ. Human Coagulation Factor X-Adenovirus Type 5 Complexes Poorly Stimulate an Innate Immune Response in Human Mononuclear Phagocytes. J Virol. 2015;89:2884–2891.

[4] Gao YJ, Liu DL, Li S, et al. Down-regulation of CXCL11 inhibits colorectal cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition. Onco Targets Ther. 2018;11:7333–7343.

[5] Siednienko J, Nowak J, Moynagh PN, et al. Nitric oxide affects IL-6 expression in human peripheral blood mononuclear cells involving cGMP-dependent modulation of NF-κB activity. Cytokine. 2011;54:282–288.

[6] Faure E, Poissy J, Goffard A, et al. Distinct immune response in two MERS-CoV-infected patients: Can we go from bench to bedside? PLoS One. 2014;9.

[7] Wang H, Yuan M, Wang S, et al. STAT3 Regulates the Type I IFN-mediated antiviral response by interfering with the nuclear entry of STAT1. Int J Mol Sci. 2019;20.

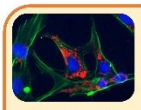
[8] Chen Y, Pawlikowska L, Yao JS, et al. Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. Ann Neurol. 2006;59:72–80.

[9] Li Z, Chao TC, Chang KY, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFα expression through its interaction with hnRNPL. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:1002–1007.

[10] Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, et al. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion. Cell J. 2015;16:538–545.

Annexe 4 : Présentation des résultats liés au neurotropisme et à la neuroinflammation suite à l'infection par le RVFV

I. Poster 1 : XXIV^emes Journées Francophones de Virologie



Les astrocytes : un type de cellule gliale permissive à l'infection par le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV)

Jordan Quellec[1,2,3], Aurélie Pédarrieu[2], Jonathan Barthélémy[3], Camille Piro-megy[2], Yannick Simonin[1,3], Sara Salinas[3] and Catherine Cêtre-Sossah[2]

[1] Université de Montpellier [2] UMR ASTRE, F-34398, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France [3] Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections (PCCEI), MUSE, Inserm, EFS, Montpellier, France

Virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) et neuropathogénèse : une forme sévère peu maitrisée

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une arbovirose émergente et ré-émergente responsable d'épidémies majeures survenant principalement en Afrique. Chez l'Homme, plusieurs formes cliniques sont décrites, dont une forme neurologique potentiellement mortelle, mais la sévérité de l'infection est variable en fonction des épidémies et des individus[1]. La neuropathogénèse de la FVR chez l'homme et le neurotropisme du RVFV sont encore mal connus. Dans ses formes neurologiques, l'infection induit une nécrose du tissu nerveux associée à une importante invasion leucocytaire. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces lésions ne sont pas encore élucidés : sont-ils dus à une activité lytique virale ou à une réponse inflammatoire[2] ?

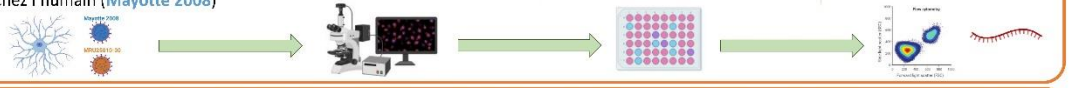
Infection des astrocytes par le RVFV : une 1ère étape dans l'étude du neurotropisme du RVFV

Infection *in vitro* des astrocytes humains par 2 souches de RVFV phylogénétiquement différentes : une souche isolée chez des dromadaires (MRU25010-30) et une autre isolée chez l'humain (Mayotte 2008)

Analyse de la sensibilité des astrocytes à l'infection par **immunomarquage** et **microscopie à épifluorescence**

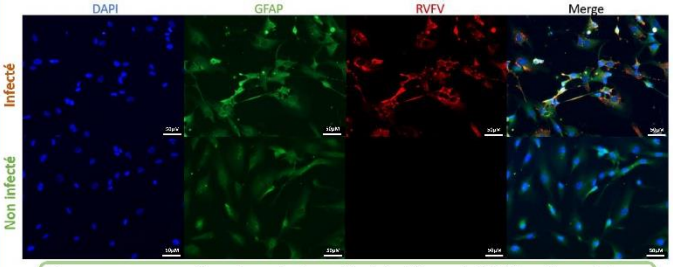
Mesure de la permissivité des astrocytes et de la cinétique de réplication par titrage avec la **méthode TCID50**

Analyse de la réponse immunitaire induite par les astrocytes infectés (**RTqPCR** et **cytométrie en flux**)

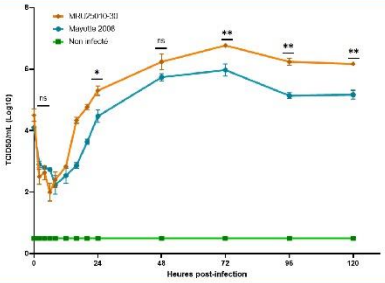


Permissivité des astrocytes humains et induction d'une réponse inflammatoire suite à l'infection par le RVFV

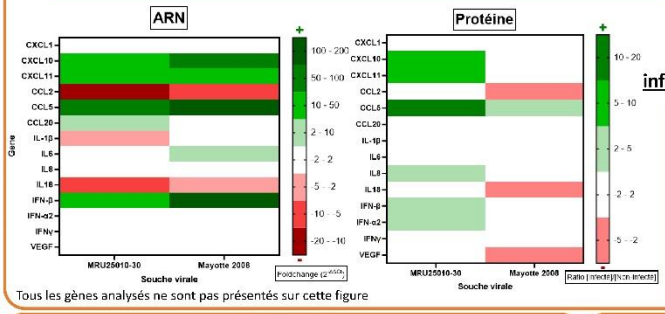
✓ **Le RVFV peut infecter les astrocytes et se répliquer**



Immunomarquage des astrocytes humains infectés par le RVFV confirmant leurs sensibilités (DAPI : noyau, GFAP : Cytosquelette des astrocytes, RVFV : protéine structurale du RVFV)



- Augmentation significative du titre viral entre 12 et 16 heures post-infection (hpi) avec un pic à 48hpi,
- Réplication plus précoce et titres plus élevés pour MRU25010-30 comparés à Mayotte 2008.



Tous les gènes analysés ne sont pas présentés sur cette figure

✓ **L'infection des astrocytes induit une réponse inflammatoire combinée à une réponse interféron de type I**

- Surexpression de gènes liés à la réponse inflammatoire (CCL, CXCL10,...) ou à la réponse interféron de type I (IFN-β, OAS2,...)
- Différence d'expression des cytokines sécrétées entre les souches malgré un profil d'expression similaire
- Confirmation de la capacité du RVFV à inhiber la réponse immunitaire[3,4], au niveau traductionnel ou post-traductionnel (Mayotte 2008)

Conclusion

- Les astrocytes humains, des cellules gliales présentes dans le système nerveux central, sont permissifs à l'infection par le RVFV → **Confirmation du neurotropisme du RVFV**
- L'infection par le RVFV semble induire une mortalité des astrocytes après 48hpi...
- ... mais la réponse inflammatoire observée pourrait être responsable d'une perturbation de l'homéostasie du système nerveux → **Neuropathogénèse directe et/ou indirecte ?**
- Variabilité inter-souches : capacité de réplication, réponse immunitaire observée → **Variabilité de la sévérité des infections ?**

Remerciements

- Les figures et illustrations ont été crées avec BioRender.com.
- Remerciements au DP OHOI (Dispositif en Partenariat One Health Océan indien) pour le financement.
- Remerciements particuliers à ONARDEL et GDS976 pour le travail de terrain et la collecte d'échantillons.

Références

[1] Javelle et al., 2020, The challenging management of Rift Valley Fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. In *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 19 (1), p. 4. DOI: 10.1186/s12941-020-0346-3.

[2] Bird and McElroy, 2016, Rift Valley fever virus: Unanswered questions. In *Antiviral research* 132, pp. 274–280. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.07.005.

[3] McElroy and 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. In *Virology* 422, pp. 6-12. DOI: 10.1016/j.virol.2011.09.023.

[4] Boulooy et al., 2003, Genetic Evidence for an Interferon Antagonistic Function of Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs. In *Journal Of Virology* 75, pp. 1371-1377. DOI: 10.1128/JVI.75.3.1371–1377.2003

XXIV Journées Francophones de Virologie, Strasbourg, France, 11-12 Avril 2022 www.cirad.fr

II. Poster 2 : XXIV[emes] Journées Francophones de Virologie et 8th European congress for Virology

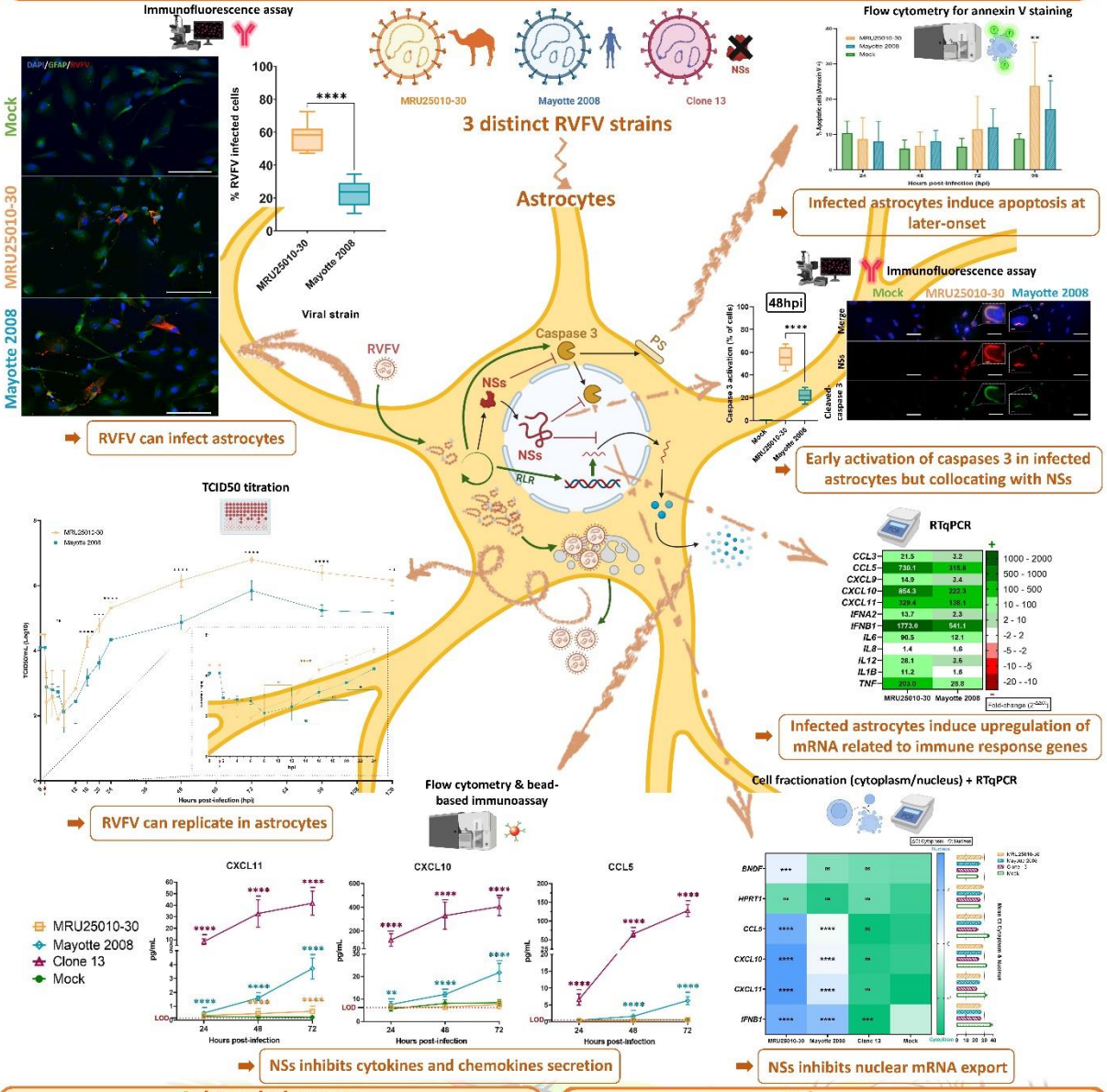
Rift Valley fever virus modulates apoptosis and immune response during infection of human astrocytes

Jordan Quellec[1,2,3], Aurélie Pédarrieu[2], Jonathan Barthélémy[3], Camille Piro-megy[2], Yannick Simonin[1,3], Sara Salinas[3] and Catherine Cêtre-Sossah[2]

[1] University of Montpellier [2] UMR ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France [3] UMR PCCEI, MUSE, Inserm, EFS, Montpellier, France

Rift Valley fever virus (RVFV) and human neuropathogenesis : a severe form poorly characterized

Rift Valley fever (RVF) is an emerging arboviral disease of zoonotic origin that causes recurrent and major epidemics mainly in Africa. Primarily occurring in livestock (sheep, goats, bovines and camels), RVF also affects human with severe clinical manifestations, including potentially fatal neurological disorders [1]. However, human neuropathogenesis of RVFV is still poorly characterized [2]. In order to explore the interactions between RVFV, particularly its virulent factors such as NSs protein [3], and the human central nervous system (CNS), we focused on RVFV *in vitro* infection of astrocytes, the major glial cells of the CNS that have several supporting roles in the CNS homeostasis including immune response regulation [4].



Acknowledgments

- Figures and illustrations were edited with BioRender.com.
- Special thanks to Dr Bezeid Ould El Mamy and Moustapha Lo (ONARDEP, ISRA-LNERV) and GDS976 for the fieldwork and samples collection and Dr Marie Flamand (Institut Pasteur Paris), for her kind gift of RVF anti-NSs antibodies

References

[1] Javelle et al., 2020. The challenging management of Rift Valley fever in humans: literature review of the clinical disease and algorithm proposal. In *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 19 (1), p. 4. doi: 10.1186/s12941-020-0346-5.

[2] Connors KA and Hartman AL. 2022. Advances in understanding neuropathogenesis of Rift Valley fever virus. *Annu Rev Virol*. 9:437–450.

[3] Wang X, Yuan Y, Liu Y and Zhang. 2022. Arm race between Rift Valley fever virus and host. *Front Immunol*. 13:1084230. doi: 10.3389/fimmu.2022.1084123.

[4] Jensen CJ, Massie A, De Keyser J, 2013. Immune players in the CNS: the astrocyte. *J Neuroimmune Pharmacol*. 8:874–839.

Annexe 5 : Réactifs utilisés pour l'approche *in vitro* d'interférence avec les récepteurs astrocytaires LRP1 et DC-SIGN

Tableau 3 : Liste des réactifs utilisés pour explorer *in vitro* l'implication des récepteurs LRP1 et DC-SIGN dans le cycle de réplication du RVFV chez les astrocytes

Réactifs	**Concentration** (µg/mL)	**Référence**	**Fournisseur**
IgG2b monoclonal de souris anti-DC SIGN humain	0,5 et 5	MAB161	R&D Systems
IgG2b monoclonal de souris anti-CD11 bovin	5	MCA1425GA	Serotec
LRPAP recombinante humaine	0,5 et 5	4296-LR	R&D Systems
Bovine Serum Albumin (BSA)	5	A7906	Sigma-Aldrich

Annexe 6 : Données supplémentaires de l'article 2 "Rift Valley fever virus is able to cross the human blood brain barrier *in vitro* by direct infection with no deleterious effect"

Table S1: Primers and probes used for RVFV viral quantification by RTqPCR

Target gene	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'-3'	Probe	Reference
β-Actin Exon 4-5	CAGCACAATGAAGATCAAGATCATC	CGGACTCATCGTACTCCTGCTT	TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT	[1]
RVFV, L (Large) Segment	TGAAAATTCCTGAGACACATGG	ACTTCCTTGCATCATCTGATG	CAATGTAAGGGGCCTGTGTGGACTTGTG	[2]

[1] Toussaint et al., 2007, Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J. Virol. Methods 140, 115–123

[2] Bird et al., 2007, Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. J. Clin. Microbiol. 45, 3506–3513

Table S2: Cycling conditions used for RVFV viral quantification by RTqPCR

Reference of the kit used	Cycling conditions			
AgPath-ID One Step RTqPCR (Applied Biosystems, USA)	cDNA synthesis	Inactivation	Amplification (40 cycles)	
	45°C, 10min	95°C, 10min	95°C, 15s	60°C, 1min

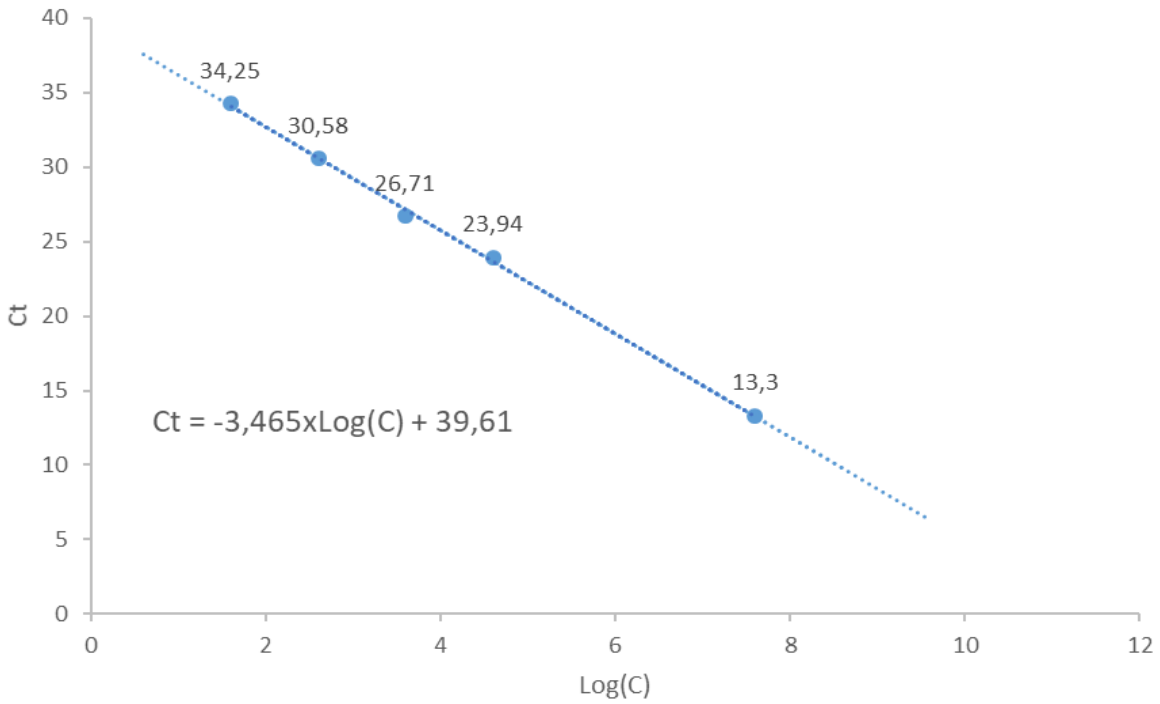


Figure S1: Standard curve between Ct values of Clone 13 measured by RTqPCR on Vero cells and viral titers expressed in TCID50/mL Log10 (Log (C)).

Table S3: Primers used for mRNA expression analysis by RTqPCR

Target gene	Full Name/Accession number	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'-3'	Reference
CASP3	Caspase 3 / NM_004346	TGGCGAAATTCAAAGGATG	TAACCCGGGTAAGAATGTGC	[1]
CASP9	Caspase 9 / NM_001229	GCAGTAACCCCGAGCCAGATG	CCGGAGGAAATTAAAGCAACCAG	[1]
CCL5	C-C motif ligand 5 / NM_002985	CTCATTGCTACTGCCCTCTGCGCTCCTGC	GCTCATCTCCAAAGAGTTGATGTACTC	[2]
CLDN5	Claudin 5 / NM_001130861.1	TTAACAGACGGAATGAAGTT	AAGCGAAATCCTCAGTCT	[3]
CSF2	Colony stimulating factor 2 / M11220.1	ATGTTTGACCTCCAGGAGCC	GGTGATAATCTGGGTTGCACA	[4]
CXCL10	C-X-C motif ligand 10 / NM_001565	TATTCCTGCAAGCCAATTTTGTC	TCTTGATCGCCTTCGATTCTG	[5]
CXCL11	C-X-C motif ligand 11 / NM_005409	GACGCTGTCTTTGCATAGGC	GGATTTAGGCATCGTTGTCCTTT	[6]
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 / NM_000194.3	AGCTTGCTGGTGAAAAGGAC	TTATAGTCAAGGGCATATCC	[7]
IFNA1	Interferon alpha 1 / NM_024013	TGGCTGTGAAGAAATACTTCCG	TGTTTTCATGTTGGACCAGATG	[8]
IFNA2	Interferon alpha 2 / NM_000605	CTTGAAGGACAGACATGACTTTGGA	GGATGGTTTCAGCCTTTTGGA	[9]
IFNB1	Interferon beta 1 / NM_000605	GTCTCCTCCAAATTGCTCTC	ACAGGAGCTTCTGACACTGA	[10]
IFNG	Interferon gamma / NM_000619	CTTTAAAGATGACCAGAGCATCCA	ATCTCGTTTCTTTTTGTTGCTATTGA	[11]
IFNL1	Interferon lambda 1 / NM_172140.2	CACGCGAGACCTCAAATATGTG	AGGGTGGGTTGACGTTCTCA	[12]
IFNL2/3	Interferon lambda 2/3 / NM_172138.2/NM_001346937.2	GCCACATAGCCCAGTTCAAGTC	GGCATCTTTGGCCCTCTTAAA	[12]
IL1B	Interleukin 1B / NM_000576	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA	[13]
IL6	Interleukin 6 / NM_000600	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC	CCCAGGGAGAAGGCAACTG	[14]
ISG15	Interferon stimulated gene 15 / NM_005101	TGTCGGTGTCAGAGCTGAAG	GCCCTTGTTATTCCTCACCA	[15]
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2 / NM_004530	GAGCTCTATGGGGCCTCTCC	CGTCACAGTCCGCCAAATGA	[16]
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9 / NM_004994.3	GGGAAGATGCTGCTGTTCA	AACTCACTCCGGGAACTCAC	[17]
OCLN	Occludin / NM_002538.4	TTCTGGATCTCTATATGGTTCA	CCACAACACAGTAGTGATAC	[3]
TGFB1	Tumor Growth Factor beta 1 / NM_000660.7	AAGGACCTCGGCTGGAAGTG	CCCGGGTTATGCTGGTTGTA	[18]
TNFA	Tumor Necroting factor alpha / NM_000594	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	[19]
TJP1	Tight Junction Protein 1 / NM_003257.5	CCTGAACCAGTATCTGATAA	AATCTTCTCACTCCTTCT	[3]

[1] Li Z, Guo D, Yin X, Ding S, Shen M, Zhang R, Wang Y, Xu R. Zinc oxide nanoparticles induce human multiple myeloma cell death via reactive oxygen species and Cyt-C/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 signaling pathway in vitro. Biomed Pharmacother. 2020 Feb;122:109712. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109712. Epub 2019 Dec 30. PMID: 31918281.

[2] Vaday GG, Peehl DM, Kadam PA, Lawrence DM. Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer. Prostate. 2006 Feb 1;66(2):124-34. doi: 10.1002/pros.20306. PMID: 16161154.

[3] Chang KF, Liu CY, Huang YC, Hsiao CY, Tsai NM. Downregulation of VEGFR2 signaling by cedrol abrogates VEGF-driven angiogenesis and proliferation of glioblastoma cells through AKT/P70S6K and MAPK/ERK1/2 pathways. Oncol Lett. 2023 Jun 22;26(2):342. doi: 10.3892/ol.2023.13928. PMID: 37427338; PMCID: PMC10326829.

[4] Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(7):2725-9. doi: 10.1073/pnas.87.7.2725. PMID: 2181447; PMCID: PMC53763.

[5] Eichholz K, Mennechet FJ, Kremer EJ. Human coagulation factor X-adenovirus type 5 complexes poorly stimulate an innate immune response in human mononuclear phagocytes. J Virol. 2015 Mar;89(5):2884-91. doi: 10.1128/JVI.03576-14. Epub 2014 Dec 24. PMID: 25540380; PMCID: PMC4325717.

[6] Gao YJ, Liu L, Li S, Yuan GF, Li L, Zhu HY, Cao GY. Down-regulation of CXCL11 inhibits colorectal cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition. Onco Targets Ther. 2018 Oct 23;11:7333-7343. doi: 10.2147/OTT.S167872. PMID: 30425523; PMCID: PMC6205823.

[7] Siednienko J, Nowak J, Moynagh PN, Gorczyca WA. Nitric oxide affects IL-6 expression in human peripheral blood mononuclear cells involving cGMP-dependent modulation of NF-κB activity. Cytokine. 2011 Jun;54(3):282-8. doi: 10.1016/j.cyto.2011.02.015. Epub 2011 Mar 16. PMID: 21414799.

[8] Zhao Q, Liang D, Sun R, Jia B, Xia T, Xiao H, Lan K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded replication and transcription activator impairs innate immunity via ubiquitin-mediated degradation of myeloid differentiation factor 88. J Virol. 2015 Jan;89(1):415-27. doi: 10.1128/JVI.02591-14. Epub 2014 Oct 15. PMID: 25320320; PMCID: PMC4301122.

[9] Löseke S, Grage-Griebenow E, Wagner A, Gehlhar K, Bufe A. Differential expression of IFN-alpha subtypes in human PBMC: evaluation of novel real-time PCR assays. J Immunol Methods. 2003 May 1;276(1-2):207-22. doi: 10.1016/s0022-1759(03)00072-3. PMID: 12738374.

[10] Faure E, Poissy J, Goffard A, Fournier C, Kipnis E, Titecat M, Bortolotti P, Martinez L, Dubucquoi S, Dessein R, Gosset P, Mathieu D, Guery B. Distinct immune response in two MERS-CoV-infected patients: can we go from bench to bedside? PLoS One. 2014 Feb 14;9(2):e88716. doi: 10.1371/journal.pone.0088716. PMID: 24551142; PMCID: PMC3925152.

[11] Mallampalli RK, Adair J, Elhance A, Farkas D, Chafin L, Long ME, De M, Mora AL, Rojas M, Peters V, Bednash JS, Tsai M, Londino JD. Interferon Lambda Signaling in Macrophages Is Necessary for the Antiviral Response to Influenza. Front Immunol. 2021 Nov 25;12:735576. doi: 10.3389/fimmu.2021.735576. PMID: 34899695; PMCID: PMC8655102.

[12] Mihm S, Frese M, Meier V, Wietzke-Braun P, Scharf JG, Bartenschlager R, Ramadori G. Interferon type I gene expression in chronic hepatitis C. Lab Invest. 2004 Sep;84(9):1148-59. doi: 10.1038/labinvest.3700135. PMID: 15208644. [13] Wang H., et al. STAT3 Regulates the Type I IFN-mediated antiviral response by interfering with the nuclear entry of STAT1. Int J Mol Sci. 2019;20.

[14] Chen Y, Pawlikowska L, Yao JS, Shen F, Zhai W, Achrol AS, Lawton MT, Kwok PY, Yang GY, Young WL. Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. Ann Neurol. 2006 Jan;59(1):72-80. doi: 10.1002/ana.20697. PMID: 16278864.

[15] Bektas N, Noetzel E, Veeck J, Press MF, Kristiansen G, Naami A, Hartmann A, Dimmler A, Beckmann MW, Knüchel R, Fasching PA, Dahl E. The ubiquitin-like molecule interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a potential prognostic marker in human breast cancer. Breast Cancer Res. 2008;10(4):R58. doi: 10.1186/bcr2117. Epub 2008 Jul 15. PMID: 18627608; PMCID: PMC2575531.

[16] Sumiya R, Terayama M, Hagiwara T, Nakata K, Sekihara K, Nagasaka S, Miyazaki H, Igari T, Yamada K, Kawamura YI. Loss of GSTO2 contributes to cell growth and mitochondria function via the p38 signaling in lung squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2022 Jan;113(1):195-204. doi: 10.1111/cas.15189. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34726807; PMCID: PMC8748250.

[17] Constant O, Maarifi G, Barthelemy J, Martin MF, Tinto B, Savini G, Van de Perre P, Nisole S, Simonin Y, Salinas S. Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood-brain barrier integrity. Emerg Microbes Infect. 2023 Dec;12(1):2156815. doi: 10.1080/22221751.2022.2156815. PMID: 36495563; PMCID: PMC9815434.

[18] Abdalla AO, Kiaii S, Hansson L, Rossmann ED, Jeddi-Tehrani M, Shokri F, Osterborg A, Mellstedt H, Rabbani H. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. Scand J Immunol. 2003 Dec;58(6):601-6. doi: 10.1111/j.1365-3083.2003.01348.x. PMID: 14636415.

[19] Li Z, Chao TC, Chang KY, Lin N, Patil VS, Shimizu C, Head SR, Burns JC, Rana TM. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFα expression through its interaction with hnRNPL. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 21;111(3):1002-7. doi: 10.1073/pnas.1313768111. Epub 2013 Dec 26. PMID: 24371310; PMCID: PMC3903238.

Table S4: Cycling conditions used for mRNA expression analysis by RTqPCR

Reference of the kit used	Cycling conditions					
	Preincubation	cDNA synthesis	Amplification (40 cycles)			Melting curve/Inactivation
RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fischer Scientific, USA)	65°C, 5min	42°C, 60min				70°C, 5min
LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Switzerland)	95°C, 10min		95°C, 15s	60°C, 15s	72°C, 25s	95°C, 5s then 65°C to 97°C

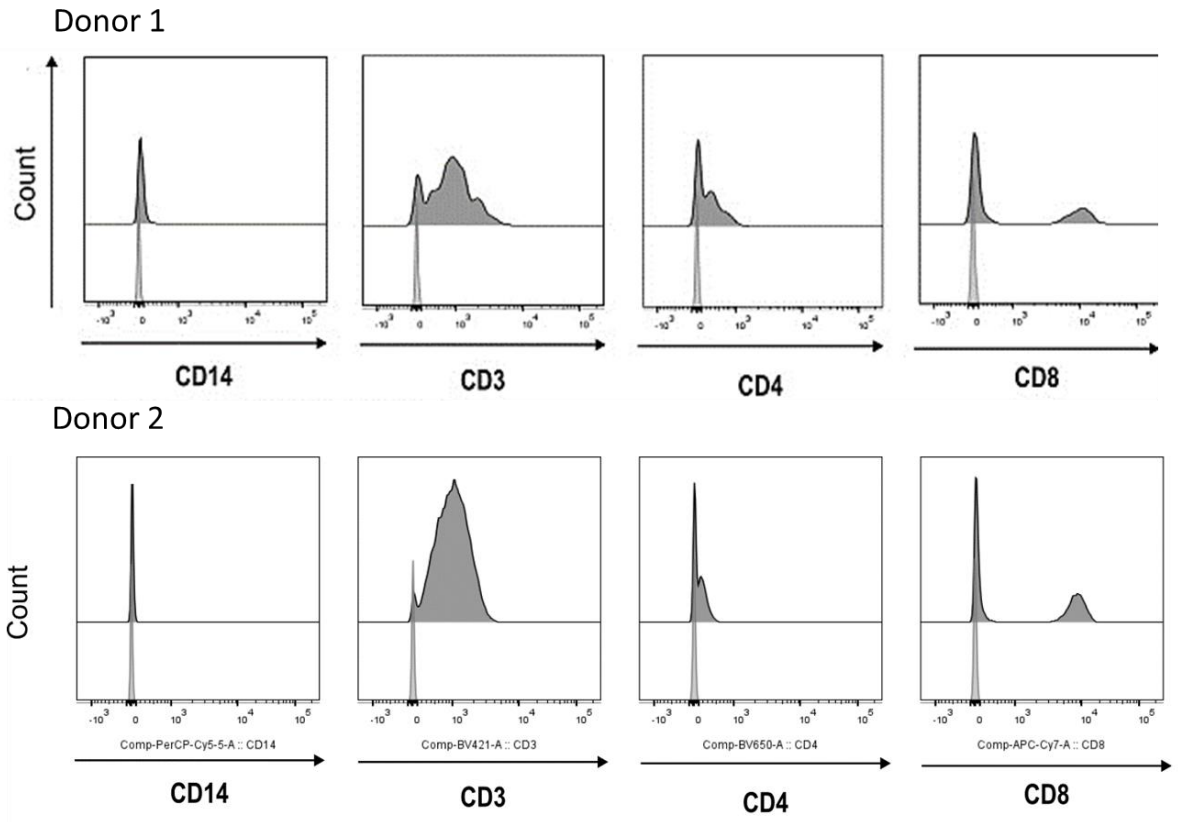


Figure S2: Phenotype of T cells analyzed by flow cytometry after surface staining (CD14, CD3, CD4 and CD8) for cell isolated from donor 1 (top panels) and donor 2 (bottom panels). Light gray: unstained cells. Dark grey: stained cells

Annexe 7 : Exploration des mécanismes de neuroinvasion par le cheval de Troie et de recrutement des lymphocytes à la BHE infectée par RVFV

Tableau 4 : Récapitulatif des réactifs utilisés dans l'exploration préliminaire du mécanisme de cheval de Troie par le RVFV via les cellules dendritiques infectées

Réactifs	Concentration (µg/mL)	Référence	Fournisseur
LPS (*Escherichia coli*, O111:B4)	1µg/mL	L4391	Sigma
Anticorps BV421-anti-CD3		UCHT1	Biolegend
Anticorps PerCP/Cy5.5-anti-CD14		HCD14	Biolegend
Anticorps FITC-anti-HLA-DR		L243	Biolegend
Anticorps PE-anti-CD209		REA617	Miltenyi

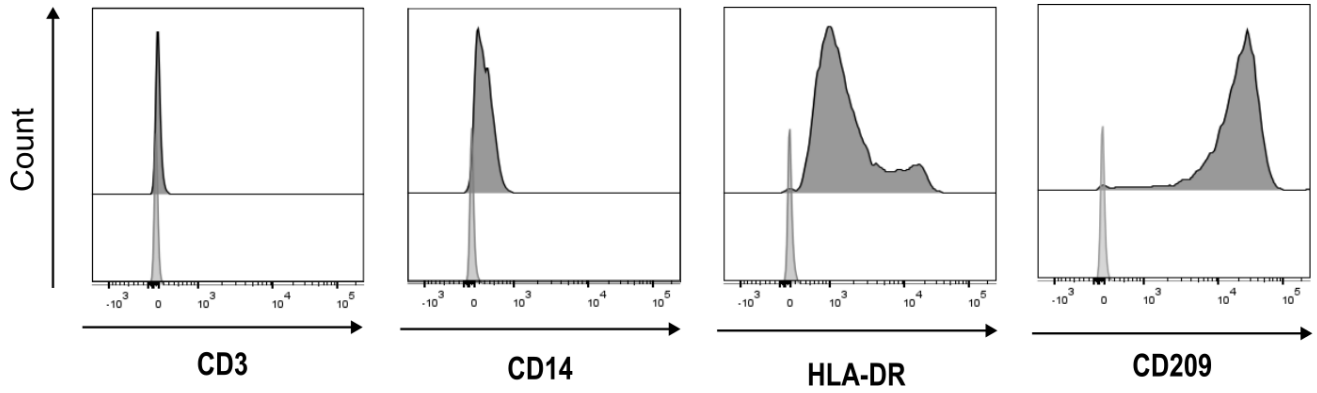


Figure 33 : Phénotype des cellules dendritiques analysées par cytométrie en flux après l'immunomarquage de la surface cellulaire (gris clair : cellules non marquées, gris foncé : cellules marquées)

Tableau 5 : Jeux d'amorces utilisés pour explorer l'expression des protéines d'adhésion par les lymphocytes T exposés à la réponse immunitaire mise en place par la BHE infectée par le RVFV, ainsi que par la BHE infectée elle-même

Gene	Nom entier	Amorce Forward 5' – 3'	Amorce Reverse 5' – 3'	Ref
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule	ACTTGACGTACCTCAGAATCTCA	CATCGTCGTACTGCACACTTT	[1]
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	ATGTGAAGCAAATCGCAGCC	CCAGCATGTTGCCCACAAAA	[1]
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule 1	GCAGACAGTGACCATCTACAGC	CCTCACACTTCACTGTCACCTC	[1]
ICAM2	InterCellular Adhesion Molecule 2	CGGATGAGAAGGTATTCGAGGT	CACCCACTTCAGGCTGGTTAC	[2]
LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1	GACATACCGCCCATCCTGAG	CACTTCTTGTCCTCCCCACA	
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1	AACAGTGTTGACATGAAGAGCC	TGTAAAACAGCACGTCATCCTT	[3]
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand-1	GCCCTGTCCATGGAACCTAC	GACGGACAAATTGCTGGCTG	[1]
SELE-E	E-selectin	CAGCAAAGGTACACACACCTG	CAGACCCACACATTGTTGACTT	[1]
SELE-P	E-selectin	ATGGGTGGGAACCAAAAAGG	GGCTGACGGACTCTTGATGTA	[1]
VCAM1	Vascular cell adhesion protein 1	GCCTCTTTCTGAGAATGCAACT	TCCACTTCCTTTCTGCTTCTTC	[1]

[1] Constant O. et al., Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood–brain barrier integrity, Emerging Microbes & Infections, 2023, 12:1

[2] Zhang Q. et al., Identification of key genes and upstream regulators in ischemic stroke, Brain and Behavior, 2019, e01319

[3] Chang K. et al., Downregulation of VEGFR2 signaling by cedrol abrogates VEGF-driven angiogenesis and proliferation of glioblastoma cells through AKT/P70S6K and MAPK/ERK1/2 pathways. Oncol Lett 26: 342, 2023

Résumé

La fièvre de la vallée du Rift (FVR) est une arbovirose d'origine zoonotique, sévissant principalement en Afrique, affectant les troupeaux de ruminants mais également les Hommes. Suite à l'infection par son agent causal, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV), les manifestations cliniques humaines sont parfois associées à des troubles neurologiques sévères encore très peu caractérisés. Le système nerveux central (SNC), considéré comme le centre de coordination de l'ensemble des fonctions du système nerveux, est composé des neurones, l'unité cellulaire fonctionnelle du système nerveux, et des cellules gliales, telles que les astrocytes, qui ont de nombreuses fonctions de support nécessaires au bon fonctionnement des neurones. Les capacités de renouvellement cellulaire étant limitées, plusieurs barrières cellulaires, telles que la barrière hémato-encéphalique (BHE), ou encore une réponse immunitaire spécifique du SNC, vont isoler et protéger le SNC du reste de l'organisme. Malgré la manifestation de troubles neurologiques chez l'Homme et l'exploration des mécanismes de neuropathogénèse chez les modèles animaux, la capacité du RVFV à infecter le SNC humain ainsi que l'origine immunitaire ou virale des dommages tissulaires observés sont encore inconnus. Le but de ce projet de thèse a été d'explorer *in vitro* la neurovirulence du RVFV chez l'Homme et notamment de confirmer son neurotropisme et d'explorer ses mécanismes de neuroinvasion. Différentes approches de biologie moléculaire et cellulaire ont permis de confirmer la capacité du RVFV à infecter les astrocytes humains, à se répliquer tout en induisant l'apoptose retardée des cellules infectées et une inhibition de la réponse immunitaire induite. Il a pu être confirmé *in vitro* que le RVFV est potentiellement capable d'accéder au SNC, par un mécanisme de neuroinvasion d'infection directe des cellules endothéliales de la BHE, sans induire d'effets délétères sur l'intégrité de cette barrière dans les temps précoces de l'infection, tout en conduisant à l'infection des cellules neurales présentes dans le compartiment mimant le SNC. A l'aide de ces travaux et de la littérature, l'origine des dommages tissulaires observés dans les formes neurologiques de RVFV semble donc être directement lié à l'infection virale associée à une inhibition de la réponse immunitaire médiée par le facteur de virulence NSs. Plusieurs facteurs cellulaires et viraux sont mis en avant pour justifier la variabilité des formes neurologiques de RVFV, en fonction de l'hôte et de la souche de RVFV. Même si l'utilisation de modèles *in vitro* plus complexes mimant les conditions biologiques réelles du SNC est nécessaire, ce travail apporte des pistes de réflexion en recherche fondamentale associées à la neurovirologie, et peut permettre la mise en place de stratégies de prévention et aider à la prédiction et la prise en charge des formes neurologiques de RVFV.

Mots-clés : Virus de la fièvre de la vallée du Rift, Neurovirologie, Neurotropisme, Barrière hémato-encéphalique, Réponse immunitaire

Abstract

Rift Valley fever (RVF) is a zoonotic arbovirosis that occurs mainly in Africa, affecting both livestock and humans. Following infection by its causal agent, the Rift Valley fever virus (RVFV), human clinical manifestations are sometimes associated with severe neurological disorders that are still poorly characterised. The central nervous system (CNS), considered to be the coordination centre for all the functions of the nervous system, is made up of neurons, the functional cellular unit of the nervous system, and glial cells, such as astrocytes, which have many support functions needed by neurons to function properly. Because of the limited cell renewal, several cellular barriers, such as the blood-brain barrier (BBB) and an immune response specific to the CNS, isolate and protect the CNS from the rest of the body. Despite the manifestation of neurological disorders and the exploration of the mechanisms of neuropathogenesis in animal models, the ability of RVFV to infect the human CNS and the immune or viral origin of the tissue damages observed are still unknown. The aim of this thesis project was to explore the neurovirulence of RVFV in humans *in vitro*, and in particular to confirm neurotropism and explore neuroinvasion mechanisms of RVFV. The use of different molecular and cell biology approaches confirms the ability of RVFV to infect human astrocytes and its replication, while inducing delayed apoptosis in infected cells and inhibiting the induced immune response. It was confirmed *in vitro* that RVFV potentially access to the CNS via the neuroinvasion mechanism of direct infection of the endothelial cells of the BBB, with no deleterious effects on the integrity of this barrier at the early stage of infection, and leading to the infection of neural cells of the compartment mimicking the CNS. On the basis of this work and the literature, the origin of the tissue damage observed in neurological forms of RVFV therefore appears to be directly linked to viral infection associated with inhibition of the immune response mediated by the virulence factor NSs. In addition, several cellular and viral factors could be highlighted to potentially justify the variability of neurological forms of RVFV depending on the host and the RVFV strain. Similarly, this *in vitro* work, which needs to be confirmed on more complex models mimicking real biological conditions of the CNS, provides insights for future fundamental research associated with neurovirology, as well as predictive clues enabling the implementation of strategies for the prevention and management of neurological forms of RVFV.

Keywords: Rift Valley fever virus, Neurovirology, Neurotropism, Blood-brain barrier, Immune response