



HAL
open science

Rôle des protéines IFITMs (Interferon Induced Transmembrane Proteins) dans la réponse antivirale innée contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Marie-Pierre Confort

► **To cite this version:**

Marie-Pierre Confort. Rôle des protéines IFITMs (Interferon Induced Transmembrane Proteins) dans la réponse antivirale innée contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift. *Immunité innée*. 2020. hal-03202778

HAL Id: hal-03202778

<https://ephe.hal.science/hal-03202778>

Submitted on 20 Apr 2021

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

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



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par Marie-Pierre CONFORT

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

ROLE DES PROTEINES IFITMs (INTERFERON INDUCED
TRANSMEMBRANE PROTEINS) DANS LA
REPONSE ANTIVIRALE INNEE CONTRE LE VIRUS DE LA FIEVRE DE
LA VALLEE DU RIFT

soutenu le 14 Décembre 2020 devant le jury suivant :

Dr Emmanuel BELAMIE – **Président**

Dr Frédérick Arnaud – **Tuteur scientifique**

Pr Bruno Canque – **Tuteur pédagogique**

Dr Cyrille MATHIEU – **Rapporteur**

Dr Philippe Marianneau – **Examineur**

Dr Andrea Cimarelli – **Examineur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Frédérick Arnaud (**Tuteur scientifique**)

Pr Bruno Canque (**Tuteur pédagogique**)



UMR 754 Infections Virales et Pathologie Comparée

50 avenue Tony Garnier 69007 LYON.

Directrice d'unité : Dr Fabienne Archer.



RESUME

Au vu de l'émergence croissante des virus transmis par les arthropodes, il est devenu nécessaire de mieux comprendre les interactions hôte-virus, notamment la réponse antivirale. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) est un virus zoonotique transmis par des arthropodes, responsable de maladies pouvant être sévères chez les ruminants et chez l'Homme, il représente une menace croissante pour la santé publique et vétérinaire. L'immunité innée viro-induite et la synthèse de facteurs de restriction sont une des premières lignes de défense contre les infections virales chez les mammifères. Parmi ces facteurs, les protéines IFITMs « Interferon Induced transmembrane proteins » codées par trois gènes (IFITM-1, -2 et -3) sont capables d'inhiber la réplication de nombreux virus pathogènes de divers familles et genres. Les IFITMs bloquent les virus à deux étapes de leur cycle. Précocement, en empêchant la fusion des membranes virales et cellulaires lors de l'entrée des virus dans la cellule puis plus tardivement, comme cela a été montré pour le Virus de l'Immunodéficience Humaine, en diminuant l'infectiosité des particules virales nouvellement produites. Mon projet a eu pour but de caractériser les interactions entre le RVFV et les IFITMs de différentes espèces. Une précédente étude a montré que le RVFV était sensible à la restriction précoce induite par les IFITM-2 et 3 humains (H2 et H3) et j'ai pu montrer que, contrairement à beaucoup d'autres virus, le RVFV (souche atténuée MP12) est résistant à la restriction tardive induite par ces IFITMs humains. D'autre part, mes résultats indiquent que les IFITMs d'autres espèces naturellement infectées par le RVFV (de bovidé et camélidé) sont capables de bloquer fortement le RVFV et en particulier les protéines IFITM-2 et -3 localisées dans les compartiments intracellulaires endosomaux. Enfin, nos données suggèrent que contrairement au RVFV, le virus Toscana appartenant au même genre (phlébovirus) est extrêmement résistant aux IFITMs humains et bovins. Ce travail illustre la complexité des interactions entre le RVFV et les IFITMs et suggère une grande hétérogénéité dans la susceptibilité ou résistance des phlébovirus aux IFITMs selon le virus, la souche virale, l'étape du cycle et les espèces considérées.

Mots clés: Arbovirus, zoonose, RVFV, facteurs de restrictions, IFITM

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier **Frédéric** qui a su me supporter, m'épauler, me soutenir, me guider et me faire confiance au quotidien. Que ce soit dans les manips ou bien lors de la rédaction de mon mémoire, il a su me laisser l'autonomie, et le temps nécessaire sans prendre trop de cheveux blancs enfin je crois. Tu as été un très bon tuteur scientifique et tu es un excellent boss ; je suis contente de travailler avec toi.

Je remercie **Maxime**, mon chef du BSL3, qui pendant ces quatre années a géré le plateau technique car j'avais moins de temps pour être sur tous les fronts. On fait une belle équipe. Et merci à **Sylvie** « La mitraille » pour avoir aidé dans une bonne partie de l'administratif du plateau technique et de ton aide au quotidien pour les missions commandes et autres.

Un immense merci à ma meilleure « coupine » collègue, amie, confidente **Barbara** alias « Babounette » qui comme, depuis que je la connais, a toujours été à mes côtés pendant ces 4 années mais aussi depuis ... hmmm 16 ans. Wowww ça ne nous rajeunit pas ma p'tite dame. Heureusement, c'est toi l'aînée. Hahaha Dès que ce sera fini à nous les soirées filles et les papotages jusqu'à point d'heure.

A Madame la DU, **Fabienne**, merci de m'avoir attendue quelques fois les soirs de manips un peu longues au moins on se binomait. Tu as fait preuve d'une grande force de caractère pendant toutes ces années ou tu as pris tes responsabilités de Directrice d'unité au pied levé. Tu as réussi à emmener tout le monde sur le bateau IVPC.

Saw-See, I appreciate every day with you. Keep your smile and your good mood. You're awesome. You have had hard time this last year but you have kept your strength of character. I will always be there for you if you need.

Aux autres collègues de l'équipe Phlebovirus, **Barbara, Sophie** mais surtout ma ribambelle de petits étudiants : **Mehdi**, on a passé des journées « Rock » au BSL3 et je pense qu'il y en aura beaucoup d'autres à venir prochainement On va reprendre les bonnes habitudes après cette pause écriture de mémoire, prépare la playlist YouTube. **Adrien**, après ton master 2 tu attaques cette année une thèse pour trois belles années ... A ce que je vois Toscana ne te fait pas peur mais en revanche la multitude de tubes à remplir et analyser et les étiquettes à imprimer t'ont fait fuir les manips IFITMs mais tu as trouvé une digne héritière pour te remplacer, **Maeva**.

Merci à mon petit rayon de soleil, **Lucie**, pour nos petites rencontres dans le BSL3 chacune avec nos virus respectifs. On aurait pu refaire le monde tous les jours et j'ai apprécié ces moments avec toi.

Un grand merci à **tous les membres de l'UMR 754**, qui ne m'ont pas beaucoup vu héhé soit dans le BSL3 pour de longues journées de manips, soit dans la salle de réunion pour une écriture endiablée ou enfin en télétravail. Attention, je serai de retour bientôt mais quand même avec de belles expériences sur mon virus préféré le Rift donc dans le BSL3.

Une très grande pensée au **Pr Christophe TERZIAN** qui m'a fait découvrir le diplôme EPHE et qui m'a motivé à me lancer dans cette aventure, et aussi au **Pr Pierre BOULANGER** avec qui j'ai passé de longs moments à discuter Science mais pas que. Vous nous avez quittés trop tôt.

Merci aux membres de mon jury de diplôme pour avoir accepté de juger mon travail de ces 4 dernières années et notamment le **Pr Bruno CANQUE**, mon tuteur pédagogique, pour m'avoir accompagné avec Frédérick dans cette aventure.

Enfin, un immense merci à ma famille, surtout mes enfants **Delphine et Kevin** qui malgré qu'ils soient devenus grands ont dû s'adapter, et s'auto-gérer lors de ces longues soirées où je rentrais très tard. J'espère que je pourrais leur accorder un peu plus de temps cette année et qu'on pourra en profiter pour faire des choses ensemble. Merci beaucoup à **Mamie Elise** qui est là présente tous les jours et qui l'a été depuis 27 longues années, j'espère te garder encore les 20 prochaines années auprès de nous. **JE VOUS AIME TOUS LES TROIS.**

✂ **MERCI** ✂

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
INTRODUCTION	13
I. Les arbovirus	13
II. Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (RVFV)	15
A. Ecologie, émergence et transmission du RVFV	16
B. Pathogénicité du RVFV	17
C. Organisation génomique et protéines virales.....	19
D. Cycle de réplication virale.....	21
III. L'immunité innée viro-induite	23
A. L'immunité innée viro-induite.	23
B. Les facteurs de restriction ISGs.....	24
C. Les ISGs et le RVFV	26
IV. Les IFITMs	26
A. La famille des IFITMs	26
B. Les IFITMs des différentes espèces.....	28
C. Activité antivirale des IFITMs 1, 2 et 3	29
D. Mécanismes d'action des IFITMs.....	33
E. Les antagonistes viraux et l'échappement à la restriction par les IFITMs.....	35
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET	36
MATERIELS ET METHODES	37
CULTURE CELLULAIRE	37
PLASMIDES D'EXPRESSION	37
TRANSFECTION DES IFITMs ET INFECTION VIRALE	38
<i>Expérience de restriction tardive avec la souche MP12.</i>	38
<i>Expérience d'infection avec une souche virulente.</i>	38
TITRATION VIRALE PAR TCID50 :.....	39
ANALYSE DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT :	39
<i>Expérience de restriction tardive avec la souche MP12.</i>	40
<i>Expérience d'infection avec une souche virulente.</i>	40
RT-qPCR	41
TEST DE REINFECTION ET ANALYSES PAR CYTOMETRIE	41
MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DES IFITMs ET DU VIRUS ET ANALYSES PAR CYTOMETRIE EN FLUX	42

RESULTATS	43
I. Résistance du RVFV à la restriction tardive induite par les	43
A. Production de stocks viraux de RVFV sur des cellules exprimant ou non les IFITMs humains... 43	
B. Mise en place du test d'infectivité pour étudier l'activité antivirale tardive des IFITMs humains sur le RVFV..... 45	
C. Les IFITMs humains ne diminuent pas l'infectivité des particules virales RVFV..... 47	
II. Effet des IFITMs de diverses espèces sur la souche virulente RVFV-ZH548.....	48
A. Alignement des séquences protéines des différents IFITMs utilisés 48	
B. Effet des IFITMs sur la réplication virale de la souche ZH548..... 49	
III. Effet des IFITMs de diverses espèces sur le virus Toscana.....	53
DISCUSSION.....	55
Résistance et susceptibilité du RVFV aux IFITMs. 55	
Effet des IFITMs sur les phenuivirus et les phlébovirus. 56	
Restriction virale des IFITMs sur le RVFV chez différentes espèces..... 58	
La restriction des IFITMs sur les phlébovirus dans le contexte global de l'immunité innée et des autres ISGs..... 60	
BIBLIOGRAPHIE	62
ANNEXES	74
ANNEXE 1 : Tartour <i>et al.</i> 2017 74	
ANNEXE 2 : Alexander <i>et al.</i> 2020 74	

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

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

AP2 : Adapator complexe 2

ARN : Acide RiboNucléique

BST2 : Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2

BTV : Fièvre Catarrhale Ovine (Bluetongue Virus)

CCHV : Virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo

CDC : Center for Disease Control and Prevention / Centre pour le contrôle et la prévention des maladies

cDNA : ADN complémentaire

CHIKV : Virus Chikungunya

CIL : Boucle cytosolique

CPE : Cytopathique Effect / Effet cytopathique

CTD : Domaine Carboxy-Terminal

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

DENV : Virus de la Dengue

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DPBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline

DUGV : Dugbe virus

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EE : Early endosomes / endosomes précoces

eIF2 α (Eukaryotic initiation factor 2 alpha) : Facteur d'initiation de traduction

eIF4B : (Eukaryotic initiation factor 4B : Facteur d'initiation de traduction

Gn et Gc : Glycoprotéine d'enveloppe

HA : Etiquette Hémagglutinine

HCoV : Coronavirus humain

HEK 293T : Human Embryonic Kidney / Cellules embryonnaires de rein humain exprimant l'antigène T

HRP : (Horse Radish Peroxidase

IFITM : Interferon-induced transmembrane protein

IFNAR : Interferon Alpha/beta Receptor

IFN- β : Interféron bêta

IFN-I : Interféron type I

IgG : Immunoglobuline G

IRF-3 : Interferon regulatory factor 3

IMD : Domaine transmembranaire 1

INRAE : Institut National de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

ISGs : Interferon Stimulated Genes

ISRE : Interferon Sensitive response element

JAK/STAT : Janus Kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription

L : polymérase virale L

LGp : Longue Glycoprotéine

L-SIGN : liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing non-integrin

LE : Late endosome / endosomes tardifs

M1 : Domaine transmembranaire 1

M2 : Domaine transmembranaire 2

MAVS : Mitochondria antiviral signaling

MDA-5 : Melanoma differentiation associated gene 5

MOI : Multiplicity of infection

MP12 : Souche atténuée de RVFV

mRNA : ARNs messagers

MVBs : Multivesicular Bodies / Corps multivésiculaires

N : Nucléoprotéine

NF κ B : Nuclear factor-kappa B

NSm : protéine Non-Structurale du segment M

NS1 : Protéine non structurale 1

NSs : protéine Non-Structurale du segment S
NTD : Domaine amino-Terminal
OSBP : Oxysterol Binding Protein
P/S : Pénicilline / Streptomycine
PFA : Paraformaldéhyde
PFU : Plaque Forming Unit
PKR : Protéine kinase R
PVDF : polyvinyl difluoride
qPCR : Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative
RE : Reticulum Endoplasmique
RIG-I : Retinoic acid-inducible gene I
RIPA : Radioimmunoprecipitation assay
RLR : RIG like récepteur
RNPs : Complexes Ribonucléoprotéiques
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Reverse transcription / Transcription inverse
RVFV / FVR : Rift Valley Fever Virus / Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
Seg-L : Segment Large
Seg-M : Segment Medium
Seg-S : Segment Small
SVF : Sérum de veau fœtal
TCID50 : Tissue culture Infectious Dose 50
TFIIH : Transcription factor II Human
TM1: Domaine transmembranaire 1
TM2: Domaine transmembranaire 2
TMD: Domaine transmembranaire 2
TOSV : Virus Toscana
TRIM5 : Tripartite motif-containing protein 5
UCBL : Université Claude Bernard Lyon

VAPA : Vésicules-Associated membrane Protein-associated A

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VSV : Virus de la stomatite vésiculaire

WNV : Virus de la fièvre du Nil Occidental

ZH501 : Souche virulente de RVFV

ZH548 : Souche virulente de RVFV

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique de la distribution des principales familles au sein des arbovirus.	14
Figure 2 : Photos d'insectes hématophages.....	14
Figure 3 : Répartition géographique du RVFV.....	15
Figure 4 : Cycle de transmission du RVFV.....	16
Figure 5 : Cycles inter-épizootiques et cycles épizootiques/endémiques.	17
Tableau 1 : Susceptibilité des animaux à l'infection par le virus de la fièvre de la Vallée du Rift.....	18
Figure 6 : Représentation schématique des Phlebovirus.....	19
Figure 7 : Représentation schématique du cycle de réplication de la RVFV.	22
Figure 8 : Activation du promoteur IFN-I et induction des gènes antiviraux lors d'une infection par un phlébovirus.....	24
Figure 9 : Action des facteurs de restriction viraux.	25
Figure 10 : Locus IFITM, modèles de conformation et domaines des IFITMs.....	27
Figure 11 : Alignement des séquences des protéines IFITM de l'Homme, de la souris, du poulet et du poisson.	29
Figure 12 : Localisation des IFITMs 1, 2 et 3 et action dans la cellule 	30
Tableau 2 : Virus restreints par les protéines IFITMs.....	31
Figure 13 : Mécanismes d'action des IFITMs en fonction du compartiment cellulaire où a lieu la fusion des membranes.....	33
Figure14 : Modèle d'inhibition de la fusion virale.....	34
Figure 15 : Analyse de la production virale et de l'expression des IFITMs humains.	44
Figure 16 : Test d'infectivité des cellules 293T par la souche RVFV-MP12.	46
Figure 17 : Test d'infectivité des particules virales de RVFV.....	47
Figure 18 : Alignement des séquences protéiques des plasmides IFITMs humains, bovins et camélidés utilisés.	49
Figure 19 : Effet des IFITMs sur le RVFV 24h post-infection.	50
Figure 20 : Effet des IFITMs sur le RVFV 48h post-infection.	51

Figure 21 : Quantification par cytométrie de flux du pourcentage de cellules infectées par RVFV.	52
Tableau 3 : Synthèse des résultats de titrages, western blot et de FACS obtenus au cours de cette étude à 24 et 48h post-infection.	52
Figure 22 : Effets des IFITMs humains et bovins sur la réplication du virus Toscana.....	54
Figure 23 : Analyse de l'expression des différentes protéines virales et cellulaires par Western Blot et effet des IFITMs sur VSV-RVFV.	56

INTRODUCTION

“ Mon projet de recherche dans le cadre de mon diplôme de l’Ecole Pratique des Hautes Etudes en Sciences de la vie et de la Terre s’est déroulé au sein de l’UMR 754 (UCBL, INRAE et EPHE) Infections Virales et Pathologie Comparée, dans l’équipe « Biologie des Phlebovirus » dirigée par le Dr Frédérick Arnaud, mon tuteur scientifique. »

I. Les arbovirus.

Les zoonoses sont des maladies affectant l’Homme et les animaux. Elles peuvent être parasitaires, bactériennes, fongiques ou virales. Les zoonoses virales font l’objet d’un réel problème de santé publique et vétérinaire avec, pour circonstance aggravante, le fait que leur émergence et leur propagation est très difficile à anticiper puis à endiguer. C’est le cas des virus transmis par des arthropodes hématophages appelés arbovirus (Arthropod-Born Viruses) qui sont aujourd’hui la cause de nombreuses maladies émergentes. Ils sont divisés en cinq grandes familles: *Togaviridae* (virus Chikungunya ; CHIKV), *Rhabdoviridae* (virus de la stomatite vésiculaire ; VSV), *Flaviviridae* (virus de la Dengue ; DENV, virus de la fièvre du Nil occidental; WNV), *Reoviridae* (« Fièvre Catarrhale Ovine»; BTV) et *Phenuiviridae* (virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo ; CCHFV, virus de la fièvre de la vallée du Rift ; RVFV, virus Toscana ; TOSV) (**Figure 1**). Anciennement appelée *Bunyaviridae*, la famille des *Phenuiviridae* est la plus grande à ce jour et comporte quatre genres (*Goukovirus*, *Phasivirus*, *Phlebovirus* et *Tenuivirus*).

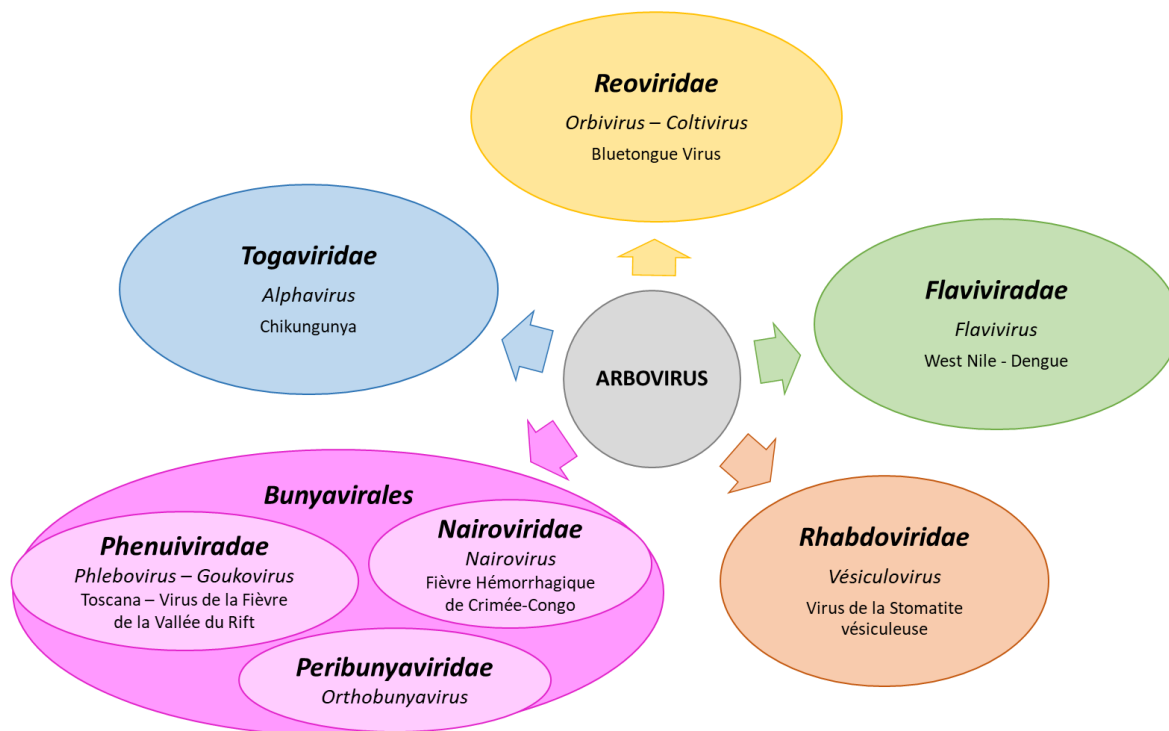


Figure 1 : Représentation schématique de la distribution des principales familles au sein des arbovirus.

Les arbovirus sont transmis à un hôte mammifère par divers arthropodes hématophages (moustiques, culicoïdes, phlébotomes et tiques) lors du repas sanguin (**Figure 2**) et l'émergence et/ou la réémergence de ces virus s'intensifient ces dernières années notamment due/s aux changements climatiques et à l'augmentation des voyages, favorisant l'expansion des insectes vecteurs de ces maladies (Bett *et al.* 2017).

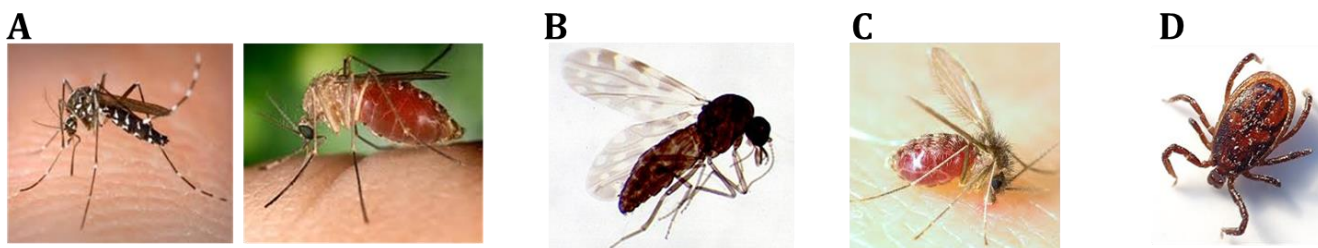


Figure 2 : Photos d'insectes hématophages **A.** Moustiques : *Aedes* spp. et *Culex* spp. **B.** Culicoïdes : *culicoïdes imicola* **C.** Phlébotomes : *Phlebotomus perniciosus* **D.** Tiques : *Ixodes ricinus*

II. Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (RVFV)

Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift a été découvert pour la première fois sur des moutons au Kenya en 1931. Les épidémies de fièvre de la vallée du rift (FVR) sont essentiellement localisées en Afrique subsaharienne, bien qu'elles se soient étendues à l'Égypte et à la péninsule arabe dans les années 2000 avec des milliers de décès humains et des pertes économiques majeures dans les pays concernés (Rolin, Berrang-Ford, et Kulkarni 2013) (**Figure 3A**). Le RVFV est classé par l'Organisation Mondiale de la Santé dans la liste prioritaire des pathogènes émergents susceptibles de provoquer de graves épidémies dans le futur et la présence en Europe et en France de vecteurs compétents (moustiques *Aedes* et *Culex*) pour transmettre le RVFV (Moutailler *et al.* 2008; Brustolin *et al.* 2017) représente une menace réelle pour de nombreuses populations humaines et animales naïves immunologiquement (Daubney, Hudson, et Garnham 1931). Malgré les conséquences importantes des épidémies de RVFV en termes de santé publique et vétérinaire mais aussi économiques avec un impact durable sur de nombreux secteurs d'activité, ce virus a été négligé par les principaux donateurs mondiaux et les programmes de lutte contre les maladies infectieuses.

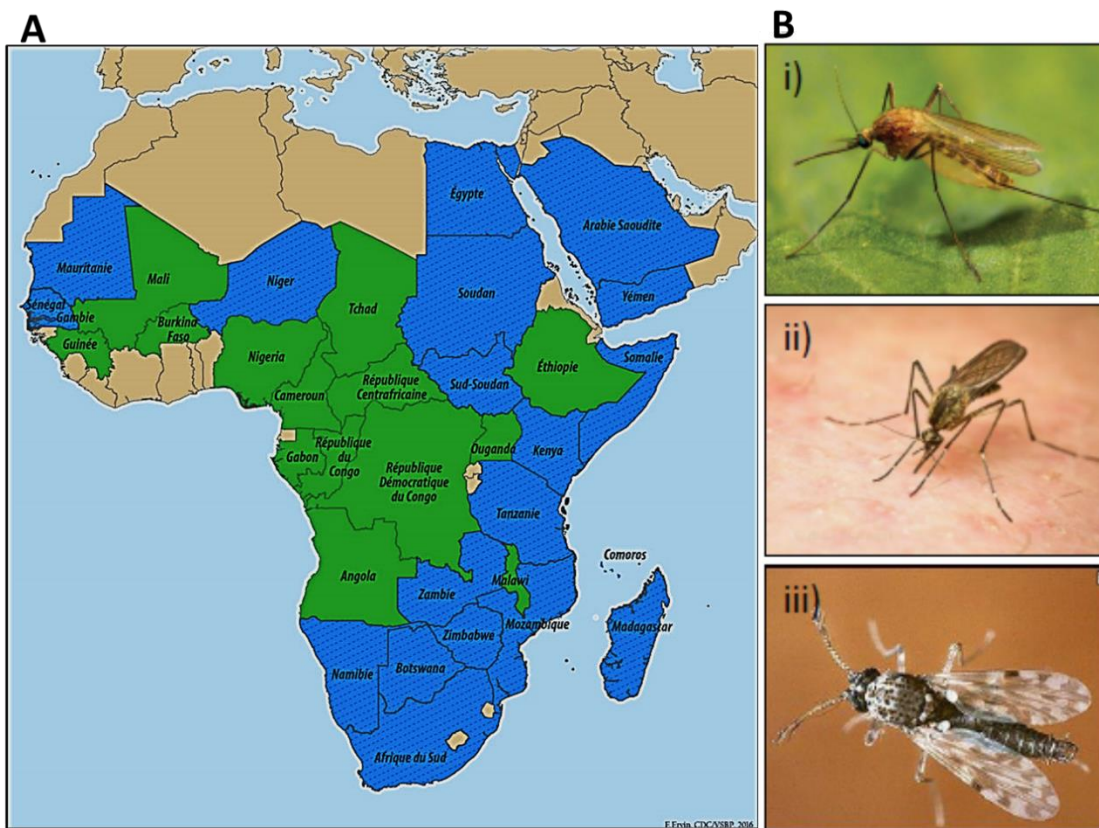


Figure 3 : A. Répartition géographique du RVFV, Bleu : pays endémiques ; vert : pays ayant peu de cas avec une détection ponctuelle du virus ; beige : statut inconnu (CDC, 2020). **B. Exemples de vecteurs arthropodes avérés ou suspectés du RVFV** : i) *Culex pipiens*, ii) *Aedes vexans*, iii) *Culex variipennis*

A. Ecologie, émergence et transmission du RVFV

Ce virus se transmet essentiellement par des piqûres de moustiques des genres *Aedes* et *Culex* (**Figure 3B**) mais, chez l'homme, la principale voie de contamination se fait lors des abattages ou des soins vétérinaires par un contact direct avec le sang et tissus contaminés. (Pepin *et al.* 2010)

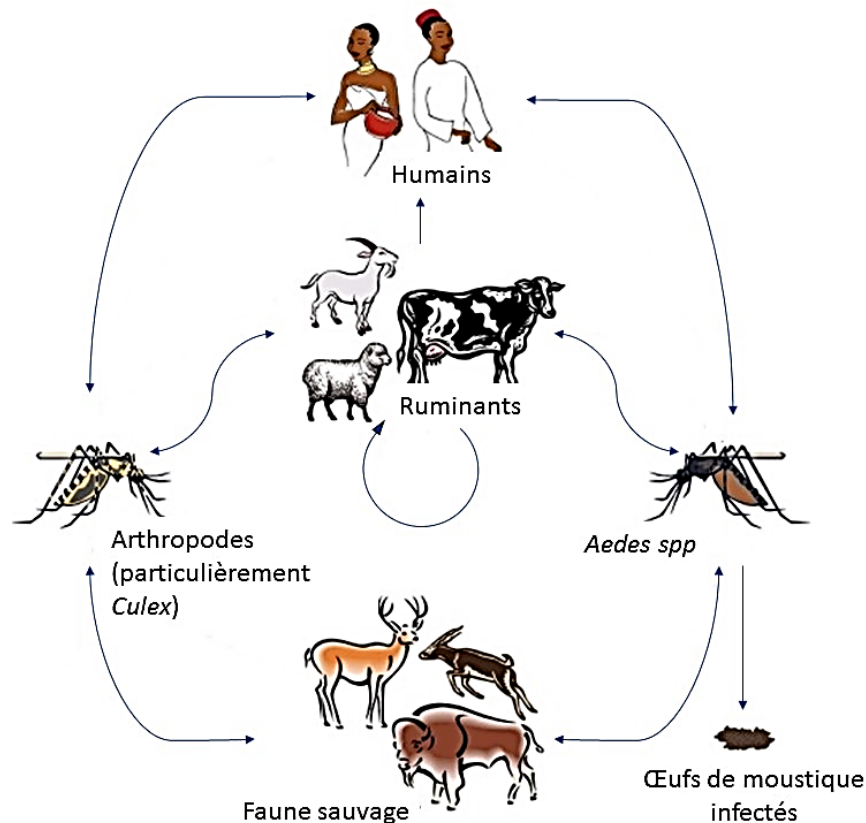


Figure 4 : Cycle de transmission du RVFV. Le RVFV se transmet aux humains ainsi qu'aux animaux sauvages et d'élevages par les arthropodes, essentiellement par les moustiques du genre *Aedes* ou *Culex*. Chez certaines espèces d'arthropodes (i.e. *Aedes*) il existe une transmission verticale à la descendance. L'Homme peut également être infecté par contact direct avec les ruminants infectés lors de soins vétérinaires ou d'abattage. Adapté de (Rolin, Berrang-Ford, et Kulkarni 2013).

De nombreuses espèces différentes de moustiques vecteurs sont capables de transmettre efficacement le RVFV avec pour vecteurs primaires d'émergence des moustiques du genre *Aedes* puis comme vecteurs secondaires d'amplification des moustiques du genre *Culex*. (Rolin, Berrang-Ford, et Kulkarni 2013) Chez les moustiques du genre *Aedes*, le RVFV peut se transmettre verticalement à la descendance ce qui permet le maintien du virus dans la nature mais aussi l'émergence de celui-ci. (**Figure 4**) En effet, des auteurs ont démontré que le RVFV pouvait être maintenu pendant les périodes inter-épizootiques notamment lors de la diapause des œufs chez *Aedes* (Favier *et al.* 2006). De plus, les cycles épizootiques sont souvent associés aux périodes de

fortes pluies et les inondations créées à ces occasions offrent un terrain et des conditions optimales à la ponte des œufs puis leur éclosion conduisant à l'émergence d'une nouvelle population de moustiques infectés. **(Figure 5)** Les chauves-souris ainsi que les rongeurs ont également été décrits comme réservoirs animaux (Hoogstraal *et al.* 1979; Calisher *et al.* 2006). Enfin, les dromadaires sont également infectés par le RVFV mais ils ne présentent généralement pas de signes cliniques très prononcés, excepté quelques avortements. Cependant, ces dromadaires infectés par RVFV peuvent être abattus pour la consommation humaine et de ce fait peuvent contaminer par les fluides (sang etc...) les fermiers propriétaires de ces animaux, et provoquer une transmission à l'homme.

Cycle inter-épizootique



Pluies normales :
Quelques flaques d'eau permettent la survie des moustiques et leur reproduction.

Cycle épizootique -endémique



Fortes pluies et inondations :
L'émergence des vecteurs est importante et l'amplification des virus se fait alors de manière efficace dans les cheptels de ruminants. 6 à 8 semaines après, les premiers cas humains sont détectés.

L'épidémie est confirmée et il y a propagation aux autres humains entraînant des mesures sanitaires.

Figure 5 : Cycles inter-épizootiques et cycles épizootiques/endémiques. Lors des cycles inter-épizootiques, les œufs de moustiques infectés peuvent être maintenus dans des flaques d'eau et lors de fortes pluies, les œufs vont alors éclore après cette diapause et il y aura une forte émergence de moustiques infectés qui vont participer à l'apparition puis à l'amplification active du virus dans les cheptels avant que les premiers cas humains.

B. Pathogénicité du RVFV

Le RVFV est un virus zoonotique à fièvre hémorragique pouvant être responsable de taux élevés de morbidité et de mortalité chez les animaux alors que d'autres animaux sont moins susceptibles voir peuvent être résistants à l'infection **(Tableau 1)**. Chez les animaux susceptibles, l'infection peut prendre des caractères différents selon l'âge, l'espèce et le statut physiologique. En effet, ce sont les très jeunes animaux qui vont être fortement touchés avec une très forte mortalité sans signes précurseurs. Chez les animaux âgés de plus de 2 semaines, une forte fièvre supérieure à 42 °C

accompagnée d'autres symptômes tels que la perte d'appétit, diarrhée, ictère, jetage nasal vont être les signes d'une infection par RVFV. La mortalité va être variable de 5 à 60 % mais sera plus faible chez les animaux adultes. Chez les animaux gravides, ce sont des avortements massifs (parfois jusqu'à 100 %) qui sera le signe le plus évocateur de l'infection. (Pepin *et al.* 2010)

Hautement susceptibles	Susceptibles	Modérément susceptibles	Faiblement susceptibles (infection inapparente)	Résistants
Agneaux	Veaux	Bovins	Chameaux	Oiseaux
Chevreaux	Moutons	Chèvres	Chevaux	Reptiles
Chiots		Buffles	Porcs	Amphibiens
Chatons			Chiens	
Souris			Chats	
Hamsters			Lapins	
			Cobayes	

Tableau 1 : Susceptibilité des animaux à l'infection par le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (d'après Lefevre 1989)

L'infection par le RVFV chez les humains provoque généralement une maladie limitée, aiguë et la plupart des personnes entrées en contact avec le virus vont être asymptomatiques (environ 50% des cas) ou bien vont présenter un syndrome pseudogrippal avec fièvre, myalgie sévère et arthralgies. Cependant, le virus RVFV est capable d'infecter le foie et le cerveau et certains patients vont alors développer des formes plus sévères comme une hépatite fulminante associée à une hémorragie due à un choc cytokinique ou une encéphalite à apparition tardive. Occasionnellement, ce sera une atteinte oculaire induisant une rétinite qui sera la cause d'une perte de l'acuité visuelle pouvant aller jusqu'à la cécité. Chacune de ces formes sévères pourront conduire à des séquelles neurologiques, hépatiques et rétiniennes graves et irréversibles. Le taux de létalité chez l'Homme est généralement compris entre 1 et 3% bien que, dans les épidémies plus récentes, ce pourcentage ait augmenté (jusqu'à 45% dans les populations naïves ; (Adam, Mustafa Elkarsany, et Adam 2009).

A ce jour, il n'existe pas de vaccin humain, même si un vaccin a été développé par l'armée américaine dans les années 70, il n'est plus disponible. (Eddy *et al.* 1981; Ikegami et Makino 2009)

C. Organisation génomique et protéines virales

Le RVFV est un virus ARN enveloppé simple brin tri-segmenté et de polarité négative ou ambisens pour le segment S. **(Figure 6)** Il est composé d'une bicouche lipidique de 7 nm d'épaisseur et possède à sa surface des spicules de 9 nm de long correspondant aux glycoprotéines Gn-Gc. Sa taille se situe entre 90 et 110 nm de diamètre (Ellis *et al.* 1979) et des études ont démontré que les virions possèdent une symétrie icosaédrique (Michele Bouloy et Weber 2010).

Le génome viral est composé de 3 segments d'ARN, nommés ainsi L (Large), M (Medium) et S (Small) du fait de leur taille respective (Bird *et al.* 2009; Flick et Bouloy 2005; Ikegami et Makino 2011b). Le génome code pour 4 protéines structurales (Polymérase L, Nucléoprotéine N, les deux glycoprotéines d'enveloppe Gn et Gc) ainsi que 4 protéines non structurales (NSs codée par le segment S, LGp (aussi appelée p78), NSm et NSm' toutes trois codées par le segment M) (Besselaar et Blackburn 1991; Elliott 1997).

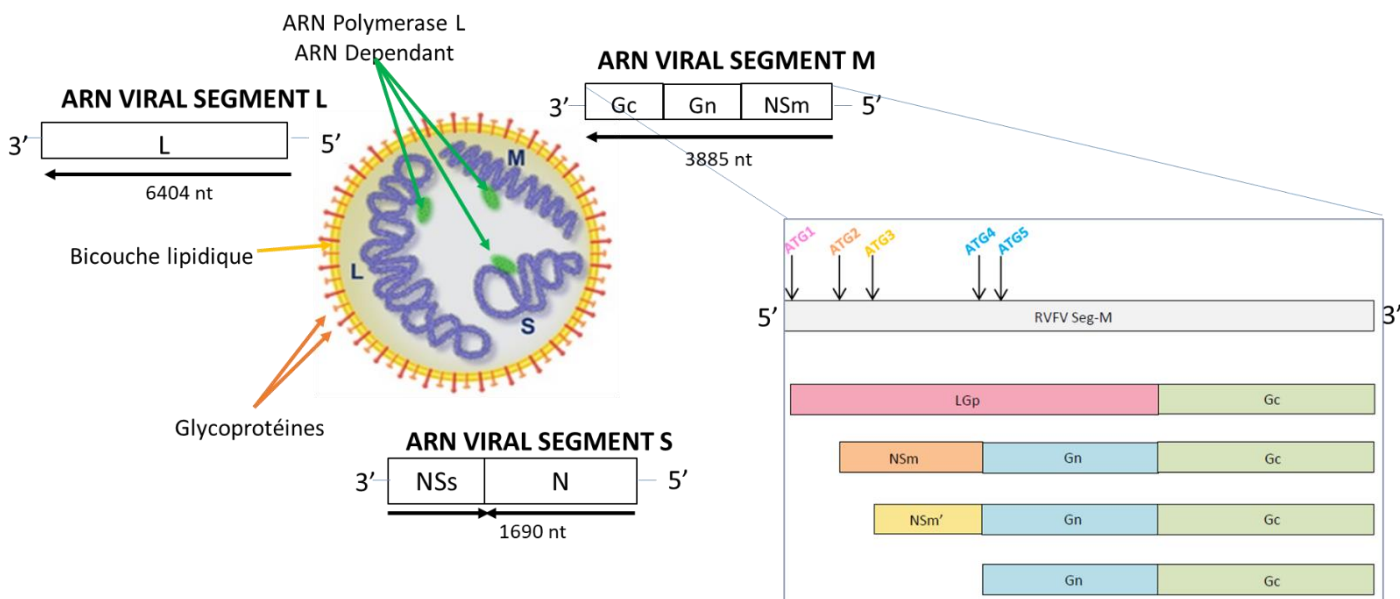


Figure 6 : Représentation schématique des Phlébovirus. Un phlébovirus est composé de trois segments d'ARN négatif : Large (L), Medium (M) et Small (S). Codant chacun pour des protéines virales : L : polymérase, NS : protéine non structurale, Gn et Gc : glycoprotéines d'enveloppe, LGp : Longue glycoprotéine et N : nucléoprotéine. Le détail des codons d'initiation servant à la synthèse de plusieurs polyprotéines qui seront ensuite clivées en protéines matures est représenté dans l'encadré de droite.

L'ARN polymérase-ARN dépendante codée par le segment L permet la réplication de l'ARN viral dans la cellule infectée. Cette protéine va permettre la réplication et la transcription de l'ARN viral de polarité négative vers un brin d'ARN de polarité positive qui servira lui-même à la traduction et la synthèse des protéines virales.

La nucléoprotéine N codée par le segment S, est la plus abondante au sein du virion en nombre de copies. Elle s'associe en nombre avec tous les ARN viraux afin de les encapsider et de les protéger. Lorsque la nucléoprotéine N s'associe avec la polymérase L, des complexes Ribonucléoprotéiques (RNPs) vont alors se former sous une forme circulaire grâce à la complémentarité des séquences 5' et 3' non traduites et permettre ainsi la formation de structures stables. Les RNPs jouent un rôle central dans le cycle viral, puisqu'ils sont les modules fonctionnels nécessaires aux étapes de transcription et de réplication.

La protéine non structurale NSs est elle aussi codée par le segment S mais de façon ambisense, c'est-à-dire que l'ARN messager est directement synthétisée à partir du segment S pour être traduit par la suite en protéine. La protéine NSs est le facteur de virulence majeur des phlébovirus et du RVFV en particulier (Lihoradova et Ikegami 2014). A des stades tardifs de l'infection, la NSs du RVFV se localise dans le noyau des cellules infectées et va inhiber l'activité transcriptionnelle globale en empêchant l'assemblage fonctionnel du facteur de transcription TFIID et agissant ainsi comme un antagoniste de la réponse antivirale et notamment de la voie de synthèse des interférons de type 1 (IFN-I) (Le May *et al.* 2004). De plus, NSs va également dégrader la Protéine Kinase R (PKR) *via* la voie du protéasome et empêcher ainsi la phosphorylation du facteur d'initiation de traduction eIF2 α (Eukaryotic initiation factor 2 alpha) responsable d'une inhibition de la traduction des protéines cellulaires et virales (Ikegami *et al.* 2009; Habjan *et al.* 2009).

Selon le codon d'initiation utilisé (ATG 1-5), le Seg-M code pour plusieurs polyprotéines qui sont ensuite clivées pour former les protéines virales matures suivantes: une glycoprotéine LGp « Long Glycoprotéine » (ATG1), deux protéines non-structurales NSm et NSm'(ATG2-3) et les glycoprotéines de surface Gn et Gc (ATG 4-5) (**Figure 6** ; Spiegel, Plegge, et Pöhlmann 2016). Les glycoprotéines virales de surface Gn et Gc sont nécessaires à l'étape d'entrée du virus. Gn s'associe aux récepteurs cellulaires lors de l'attachement du virus à la cellule tandis que Gc va permettre la fusion des membranes et ainsi l'entrée du virus et sa libération dans la cellule. Ces protéines d'enveloppe seront nécessaires aussi lors des étapes d'assemblage et de sortie des nouvelles particules virales (Spiegel, Plegge, et Pöhlmann 2016).

Le rôle des protéines non structurales comme NSm et NSm' ainsi que la LGp a été étudié mais leurs mécanismes d'action restent encore à clarifier. Les protéines NSm et NSm' (NSm' étant plus courte de quelques acides aminés) sont localisées dans les mitochondries et possèdent une activité anti-apoptotique en induisant la diminution de l'activité des caspases (Won *et al.* 2007). Bien que non essentiels à la réplication du virus *in vitro*, NSm/NSm' sont des facteurs de virulence *in vivo* dans un modèle murin immunocompétent (Kreher *et al.* 2014). Chez le moustique, la LGp du RVFV est indispensable à la dissémination du virus de l'intestin aux organes secondaires tels que les glandes salivaires (Kreher *et al.* 2014; Kading *et al.* 2014).

D. Cycle de réplication virale

Chez les phlébovirus, Gn et Gc interagissent avec des facteurs d'attachement présents à la surface des cellules. Certains de ces récepteurs sont connus tels que les héparanes sulfates ainsi que les lectines L-SIGN et DC-SIGN (Marsh et Helenius 2006; Spiegel, Plegge, et Pöhlmann 2016). Ceux-ci permettent l'attachement des virions à la membrane cellulaire puis son entrée dans la cellule. Un ou des récepteurs spécifiques restent encore à être identifier et le mécanisme d'entrée à éclaircir. Certaines études montrant un mécanisme d'entrée cavéoline-dépendant d'autres clathrine-dépendant ou bien encore par macropinocytose (de Boer *et al.* 2012; Filone *et al.* 2010). La voie d'endocytose médiée par les clathrines permet une invagination de la membrane plasmique pouvant former des vésicules de 100 nm à 150 nm de diamètre, l'entrée par macropinocytose permet la formation de vésicules de grandes tailles pouvant aller jusqu'à 1000 nm. Enfin, la taille des vésicules formée lors de l'endocytose médiée par la cavéoline est de 50 à 80-100 nm ce qui en fait un des mécanismes les plus difficiles à affirmer du fait de la taille d'une particule virale de 100 nm.

Après attachement du virion, le virus va alors être internalisé dans les endosomes précoces par deux mécanismes principaux d'entrée a) endocytose dépendante de la voie clathrine ou b) indépendante. (1,2,3) **(Figure 7)** L'acidification des compartiments endosomaux va ensuite permettre la fusion de l'enveloppe lipidique des virions et la libération dans le cytoplasme du matériel génétique viral grâce à l'activité de fusion de membrane de Gc. (4)

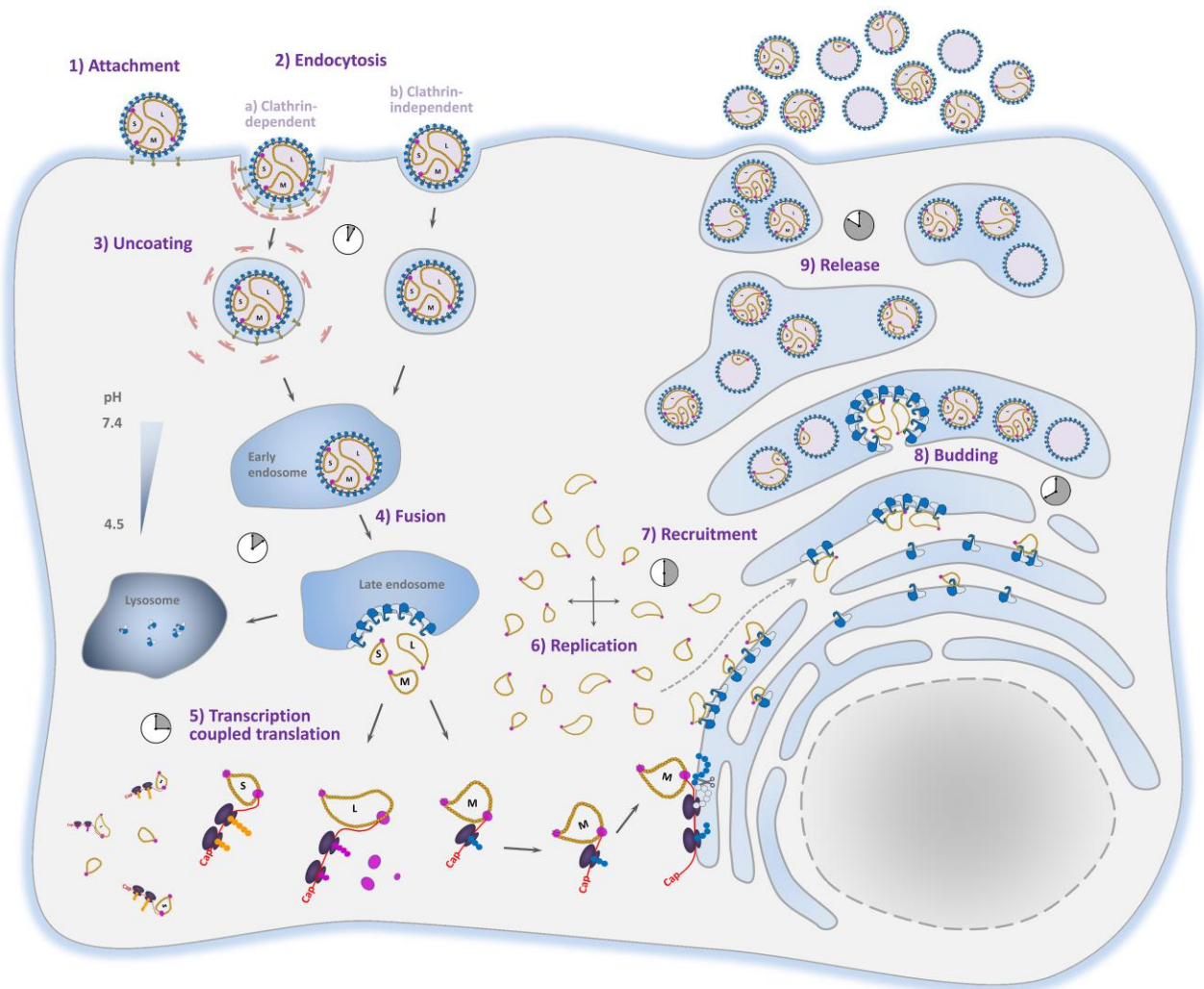


Figure 7 : Représentation schématique du cycle de réplication de la RVFV. (d'après Schreur et Kortekaas 2016) voir texte pour les détails i) entrée ii) transcription des ARN viraux iii) formation des particules virales iv) bourgeonnement au golgi v) sortie des particules virales par exocytose.

Près du site de fusion, les RNP sont utilisées comme modèles pour la transcription et la réplication (5,6). Les ARNm codés par les segments L et S sont traduits par les ribosomes libres, tandis que l'ARNm codé par le segment M est traduit par les ribosomes ancrés à la membrane du réticulum endoplasmique. Les RNP nouvellement formés (4-6 h post infection) migrent vers des sites aléatoires dans le cytoplasme, initiant des cycles de réplication supplémentaires, suivis d'un recrutement à médiation glycoprotéique vers le Golgi (7). Enfin, les glycoprotéines d'enveloppe Gn et Gc s'accumulent à la membrane de l'appareil de Golgi où l'assemblage se fait dans la lumière du Golgi.(8). Ces nouveaux virions matures contenant de zéro à trois, voire davantage de segments du génome vont alors être transportés *via* des vésicules de transport jusqu'à la membrane plasmique où ils pourront sortir par exocytose. (9)

III. L'immunité innée viro-induite

A. L'immunité innée viro-induite.

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les infections virales chez les mammifères. Lorsque le virus va pénétrer dans la cellule hôte, il va être détecté par des protéines cytoplasmiques cellulaires appelées RIG like récepteur (RLR) (**Figure 8**). Deux récepteurs MDA-5 (melanoma differentiation associated gene 5) et RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I) reconnaissent respectivement soit les ARN viraux cytoplasmiques double brin, soit les ARN viraux double brin courts possédant une extrémité 5' di ou triphosphate . L'activation de ces récepteurs induit ensuite une cascade de signalisation intracellulaire mettant en jeu la protéine « Mitochondria antiviral signaling » (MAVS) (Seth *et al.* 2005) présente à la surface des mitochondries et va conduire à la translocation par phosphorylation de deux facteurs de transcription IRF-3 (Interferon regulatory factor 3) et NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B). Cette translocation au noyau va activer la synthèse d'interféron de type I (IFN-I) et notamment celle des interférons bêta (IFN- β) et IFN α qui vont ensuite être sécrétés en dehors de la cellule. Une fois hors de la cellule ils vont pouvoir se fixer aux récepteurs IFNAR (interferon-alpha/beta receptor) des cellules voisines et induire en *trans*, par la voie JAK/STAT (Janus Kinases/Signal Transducers and Activators of Transcription), l'expression de gènes antiviraux appelés ISGs (Interferon Stimulated genes)(de Veer *et al.* 2001; Der *et al.* 1998) qui vont bloquer les virus à différentes étapes de leur cycle et possèdent un spectre d'action plus ou moins large. Parmi ces gènes antiviraux on retrouve par exemple les protéines BST2/Tetherin, PKR qui comme évoqué précédemment va bloquer la synthèse protéique (Leung, Basler, et Amarasinghe 2012) ainsi que les protéines IFITM (Interferon Induced transmembran) 1, 2 et 3 qui ont fait l'objet de mon projet de recherche et que je détaillerai plus précisément par la suite (Schoggins *et al.* 2011).

En plus de l'IFN, d'autres voies de l'immunité innée sont elles aussi impliquées dans la lutte antivirale à savoir la voie NF- κ B par la production de facteurs anti-apoptotiques et de cytokines, la voie des super oxydes ROS (Reactive Oxygen Species) qui induit l'apoptose et active la voie NF-KB ou bien encore le mécanisme de l'autophagie par lequel la cellule va s'auto-phagocyter afin de protéger l'organisme (J. Zhao *et al.* 2015; Schwarz 1996; Lapaquette, Nguyen, et Faure 2017).

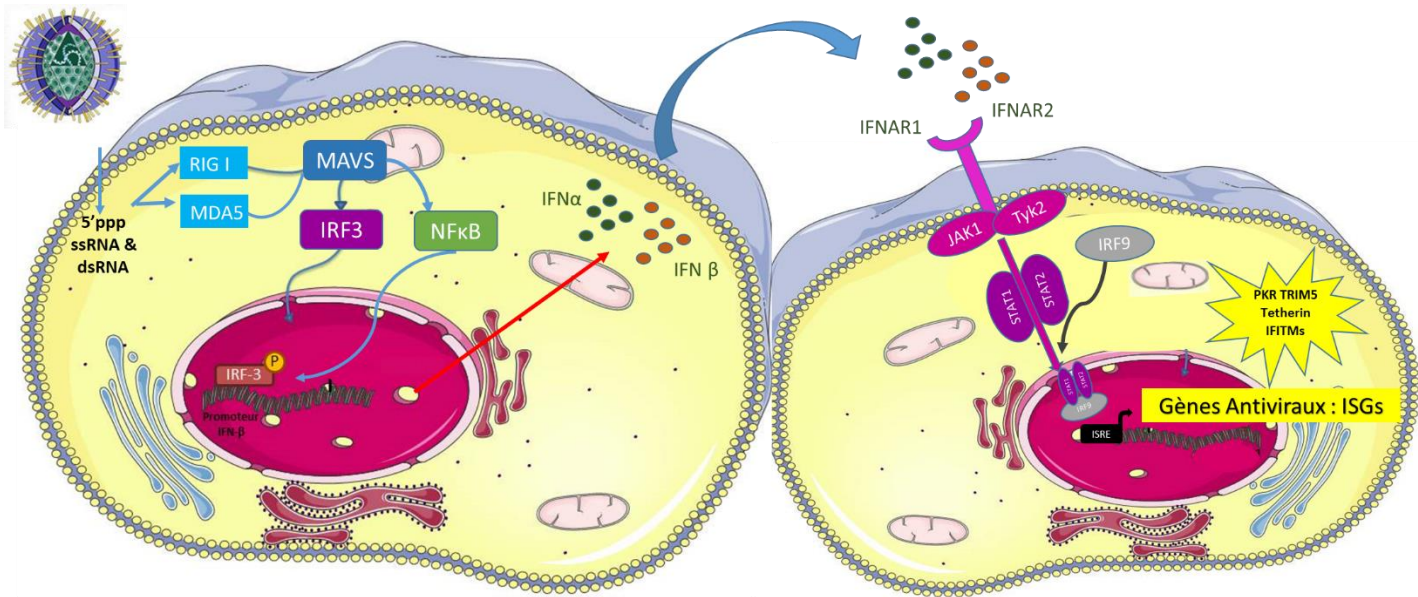


Figure 8 : Activation du promoteur IFN-I et induction des gènes antiviraux lors d'une infection par un phlébotomus. Les caractéristiques structurales et biochimiques de l'ARN du virus sont reconnues par les récepteurs RIG-I et MDA-5 dans le cytoplasme, induisant l'activation et la translocation d'IRF-3 et NF-κB dans le noyau et menant à la production d'IFNβ et d'IFNα. Ils sont ensuite sécrétés hors de la cellule pour se fixer sur les récepteurs IFN (IFNAR) qui vont activer la cascade de signalisation JAK/STAT permettant la transcription de gènes antiviraux (ISGs)

B. Les facteurs de restriction ISGs

Lors d'une infection virale, les cellules utilisent donc pour se défendre différents facteurs de restriction, appelés aussi ISGs dont l'expression est activée par l'IFN-I (IFN-β et -α) *via* une séquence conservée d'environ 15 paires de base et appelée Interferon-sensitive response element (ISRE) située dans le promoteur de chacun de ces gènes. (Kalvakolanu et Borden 1996). Les ISGs sont capables de bloquer les virus à différentes étapes de leur cycle viral, aux étapes précoces, tardives ou même encore les deux. (Schoggins 2019). De nombreuses études ont montré que le nombre d'ISGs s'étendait au-delà de 450 gènes chez l'Homme. La plupart d'entre eux a été découverte ces dernières années lors des recherches sur le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). On peut par exemple citer ces quelques exemples en plus des IFITMs que je détaillerai un peu plus par la suite. **(Figure 9)** Le premier à avoir été décrit est APOBEC3G (APOlipoprotéin B mRNA Editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) (Sheehy *et al.* 2002). APOBEC3G possède une activité antivirale en provoquant une hypermutation du matériel génétique viral lors de la transcription inverse du VIH. (Schwartz 2004) Un autre facteur TRIM5 a également été très étudié pour son activité capable d'inhiber la décapsidation du VIH après son entrée dans la cellule en interagissant avec la protéine de capsid du virus appelée Gag et donc en empêchant la réplication du génome viral (Stremlau *et al.* 2006). Enfin,

on peut citer l'exemple de BST2 (Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2) appelée aussi la tetherin chez l'Homme qui est une protéine transmembranaire localisée à la membrane plasmique des cellules et ayant la capacité assez remarquable d'ancrer les virions néoformés et bourgeonnants à la surface des cellules afin d'empêcher leur libération. Ce dernier mécanisme antiviral bloquant une étape tardive du cycle viral a été découvert pour la première fois avec le VIH-1 et depuis il s'est élargi à de nombreux autres virus enveloppés indiquant le large spectre d'action antivirale de BST2 (Neil, Zang, et Bieniasz 2008; Sakuma *et al.* 2009). Pour contrecarrer la réponse antivirale, les virus ont développé des mécanismes de protection (antagonistes viraux) permettant de se répliquer dans un contexte immunocompétent. Les protéines accessoires ou non structurales des virus jouent ce rôle et permettent aux virus d'échapper à la restriction virale de ces facteurs de restrictions. De manière générale ils agissent en dégradant des facteurs cellulaires ou bien encore en modifiant leur localisation cellulaire (García-Sastre 2017).

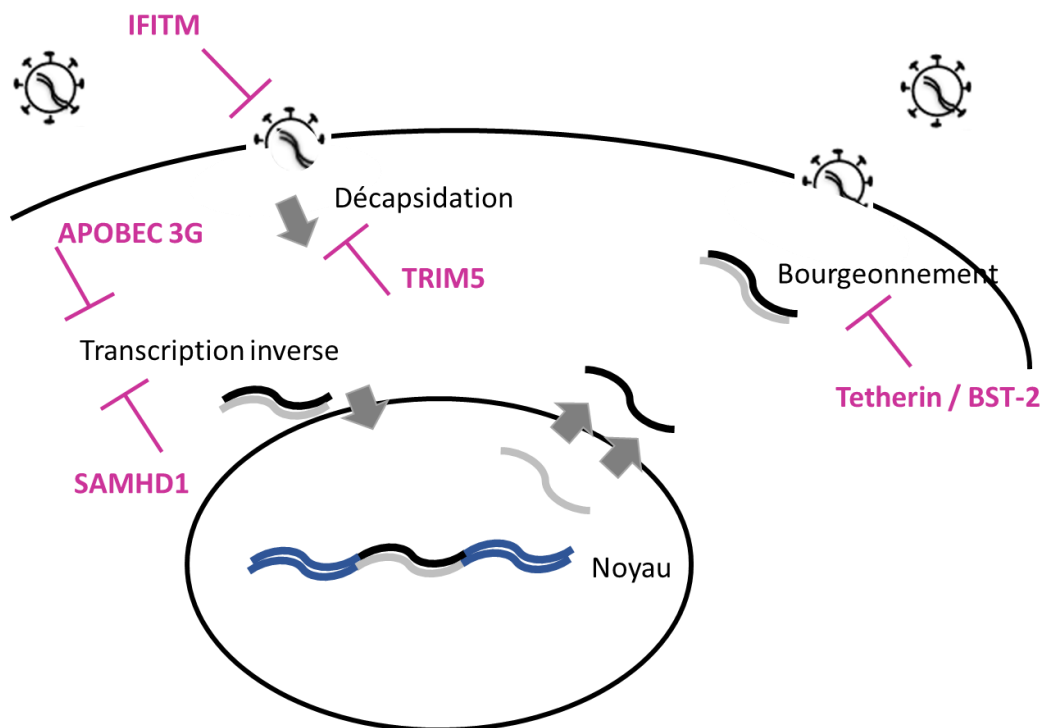


Figure 9 : Action des facteurs de restriction viraux. Les facteurs de restriction agissent à différentes étapes du cycle viral depuis l'entrée du virus dans la cellule jusqu'à son bourgeonnement hors de la cellule.

C. Les ISGs et le RVFV

Les *phenuiviridae* de manière générale semblent résistants aux diverses activités antivirales induites par les ISGs humains. Seuls quelques ISGs ont été démontrés comme étant capables d'avoir une activité antivirale. C'est le cas d'ISG-20 qui est une exonucléase capable de bloquer la réplication de la plupart des bunyavirus en les dégradant. Cependant, ISG-20 n'a aucun effet sur RVFV et ne peut inhiber sa réplication (Feng *et al.* 2018). ISG-15 joue un rôle significatif dans la défense cellulaire antivirale contre le RVFV lors d'une infection en contexte murin (Valle *et al.* 2010). ISG-15 est une protéine comme une ubiquitine et capable de modifier plus de 150 protéines à travers un mécanisme de ISGylation. Pour RVFV, elle va agir en inhibant la dégradation de la protéine IRF3 ce qui va augmenter de façon positive l'expression de l'IFN β et donc la réponse antivirale. Enfin, les IFITM-2 et IFITM-3 ont été décrits pour restreindre la réplication virale d'une souche virulente de RVFV (Mudhasani *et al.* 2013).

IV. Les IFITMs

A. La famille des IFITMs

Les protéines IFITMs sont issues d'une grande famille et sont présentes dans beaucoup d'espèces. Chez l'homme, cinq gènes sont exprimés : IFITM humain H1, H2, H3, H5 et H10 ainsi qu'un pseudogène H4. Ils sont tous situés sur le chromosome 11 (**Figure 10A**) (Hickford *et al.* 2012). Les IFITMs de 1 à 3 sont apparus plus tardivement chez l'homme et sont issus de la duplication d'un seul gène ce qui génère une très forte homologie dans leurs séquences: 91 % entre IFITM 2 et 3 et 59 % entre IFITM 1 et 2. (Tartour *et al.* 2014) La protéine IFITM 1 est tronquée dans ses 20 premiers acides aminés mais possède une extrémité C-terminale plus longue que les IFITM 2 et 3. Les IFITM 1, 2 et 3 sont ceux ayant une forte activité antivirale, ils sont exprimés à un niveau ubiquitaire et basal jusqu'à ce que l'IFN-I stimule leur expression afin de déclencher une réponse forte lors d'une infection virale. L'IFITM H5 est exprimé uniquement dans les cellules osseuses et est impliqué dans la production osseuse. Des mutations sur ce gène ont notamment été retrouvées chez des patients atteints de troubles osseux (Hanagata 2016). L'IFITM 10 semble être particulièrement conservé chez les vertébrés mais aucun rôle n'a été décrit pour l'instant (Hickford *et al.* 2012).

La structure des IFITMs permet de distinguer un domaine N-Terminal (NTD) qui est plus court pour IFITM 1 que pour 2 et 3, deux domaines transmembranaires M1 et M2, une boucle cytosolique (CIL) et un domaine C-terminal (CTD) (**Figure 10B**). Plusieurs modèles de conformation topologique possibles (**Figure 10C**) ont été proposés dans différentes publications et ceci en formulant des hypothèses sur la localisation des domaines N-terminal et C-terminal par rapport à la membrane plasmique des cellules (Bailey *et al.* 2014)

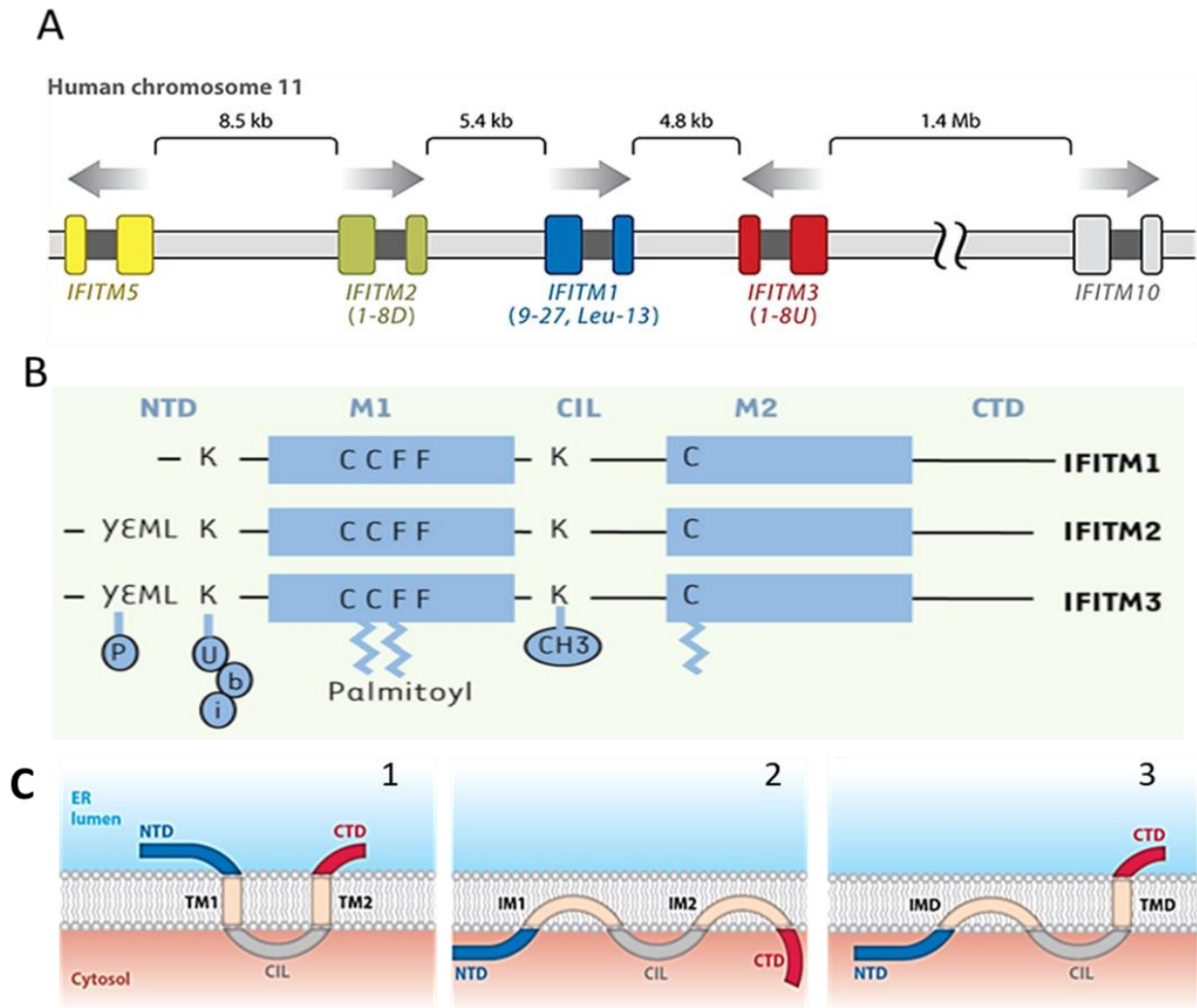


Figure 10 : Locus IFITM, modèles de conformation et domaines des IFITMs **A.** Locus des gènes IFITMs sur le chromosome 11 chez l'homme. **B.** Représentation schématique des IFITMs avec les acides aminés importants et leurs modifications. Seule IFITM3 a été étudiée en détails ; les acides aminés conservés sont représentés ; ils pourraient avoir un rôle équivalent dans les différentes IFITM :NTD : domaine amino-terminal ; M1 : domaine hydrophobe 1 ; CIL : boucle cytosolique ; M2 : domaine hydrophobe 2 ; CTD : domaine carboxy-terminal ; (d'après Tartour et Cimarelli 2015) **C.** Modèles de conformations topologiques des IFITMs. Les extrémités N-terminal et C-terminal peuvent être soit toutes les deux du côté extérieur de la membrane (1), du côté intérieur de la membrane (2) ou encore chacune d'un côté de la membrane (3) (Bailey *et al.* 2014).

B. Les IFITMs des différentes espèces

La localisation des gènes IFITMs chez les diverses espèces de mammifères ainsi que leur nombre sont très variables. Ainsi par exemple chez l'homme les 5 gènes IFITM sont situés sur le chromosome 11 alors que chez la souris ce sont 7 gènes (IFITM 6 et 7 en plus) qui vont être exprimés et leur localisation est sur le chromosome 7 (Zhang *et al.* 2012). La plupart des mammifères semblent avoir des orthologues de IFITM1, IFITM2 et IFITM3, mais aussi les poulets. Chez d'autres espèces, comme les macaques rhésus, il est plus difficile d'attribuer les deux gènes de type IFITM2/3 comme orthologues d'IFITM2 ou IFITM3 chez l'homme.

En termes de séquences on peut voir qu'elles sont assez conservées parmi les différentes espèces présentées dans la figure 15 ci-dessous ; les IFITM1 ont un domaine N-terminal plus court sauf chez les poissons. La présence d'acides aminés à la même position sur les gènes notamment une cystéine en position 72 dans le domaine transmembranaire TM1 ou bien une lysine en position 88 montrent une certaine conservation entre les séquences. Un des domaines protéiques clés est le motif de signalisation YXX ϕ présente dans la partie N-Terminale des IFITM-2 et 3 et absent des IFITM-1 (**Figure 11**). Ce domaine s'associe à la sous-unité μ 2 du complexe AP2 (adaptor complexe 2) qui entraîne l'endocytose des IFITM-2 et 3 et qui est donc responsable de la localisation de ces deux IFITMs dans les compartiments intracellulaires (Jia *et al.* 2014).

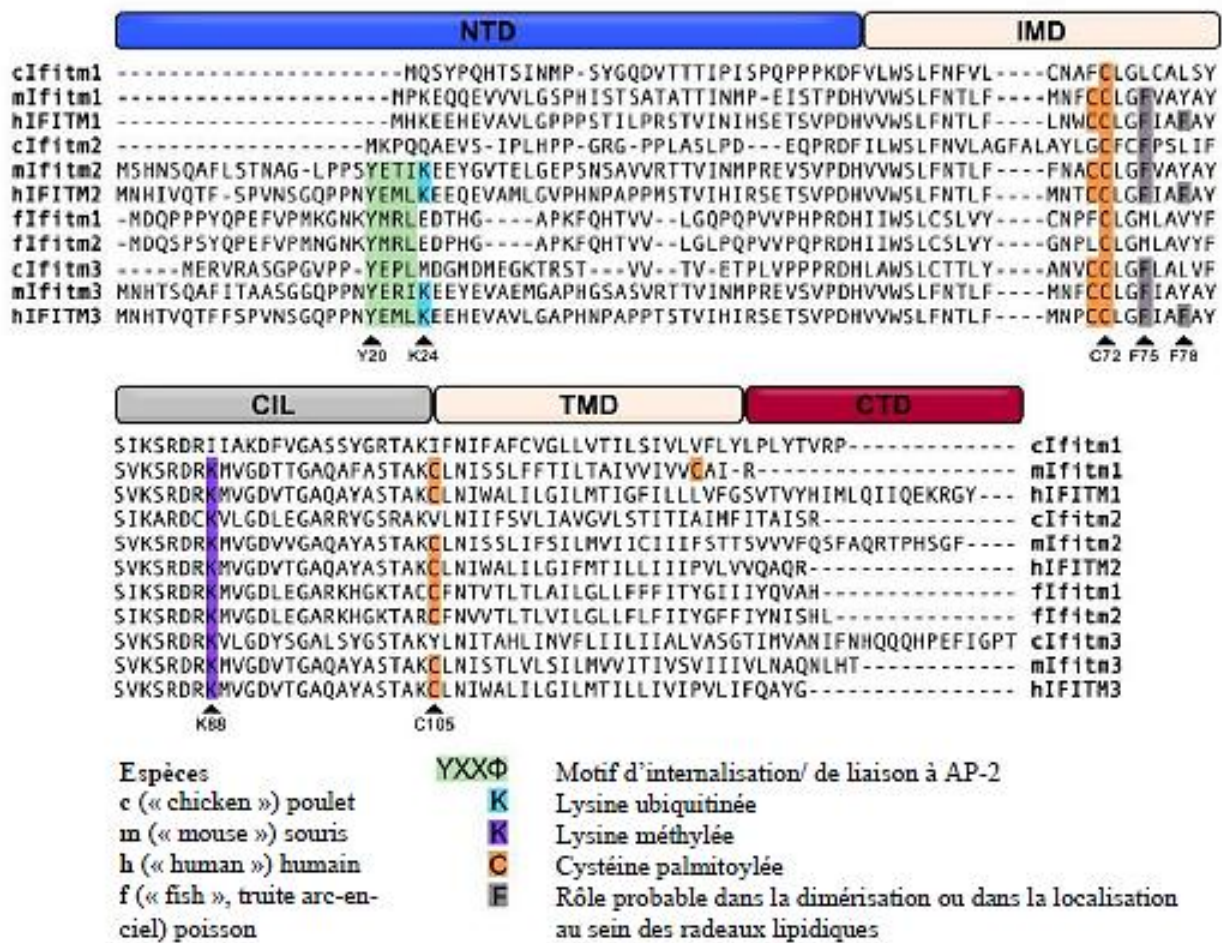


Figure 11 : Alignement des séquences des protéines IFITM de l'Homme, de la souris, du poulet et du poisson. (Figure adaptée de Bailey *et al.* 2014) Les séquences sont assez conservées entre les différentes espèces.

C. Activité antivirale des IFITMs 1, 2 et 3

Selon leur localisation dans la cellule les IFITMs sont capables de bloquer les virus à plusieurs étapes de l'entrée virale dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique et les endosomes précoces avec la forte présence d'IFITM-1 ou bien après l'internalisation des virus dans les endosomes et les lysosomes avec une localisation prononcée des IFITM-2 et -3 permettant l'inhibition de la fusion des membranes virales et cellulaires. (Figure 12)

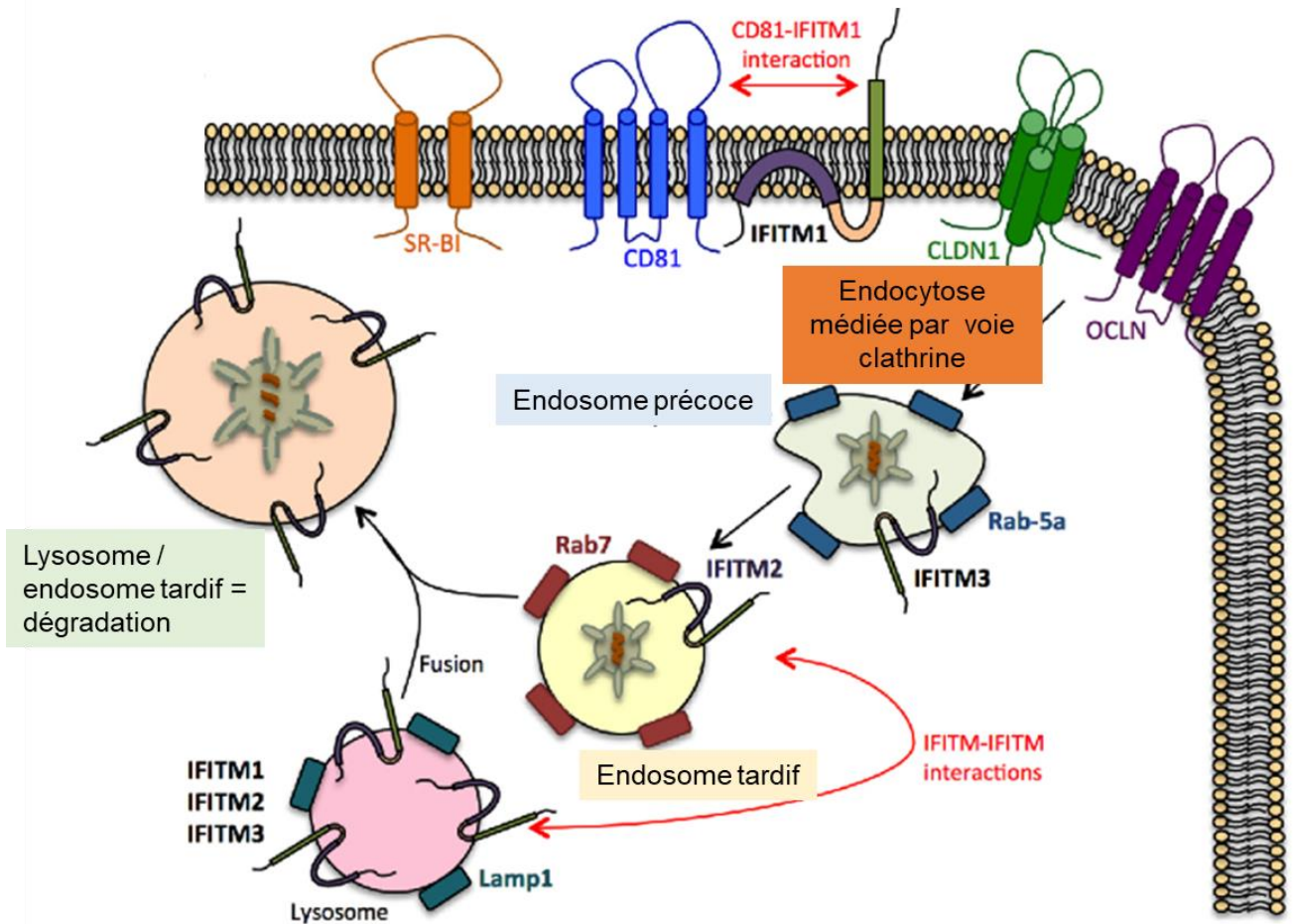


Figure 12 : Localisation des IFITMs 1, 2 et 3 et action dans la cellule (Adapté de Narayana *et al.* 2015). Les IFITMs sont présents dans différents compartiments cellulaires et interagissent lors de la pénétration du virus dans la cellule en bloquant la fusion des membranes grâce à la forte localisation d'IFITM 1 à la membrane plasmique. Ce phénomène de fusion est aussi empêché dans les compartiments intracellulaires (endosomes précoces et tardifs) avec une localisation prépondérante des IFITMs 2 et 3.

De nombreux virus sont sensibles à la restriction virale induite par les IFITMs et la spécificité de blocage par un ou plusieurs IFITMs est variable selon les virus sans que cela ne dépende des caractéristiques de chacun (virus enveloppés ou non, différents modes d'entrée dans la cellule, etc...) (**Tableau 2**).

Groupe	Famille	Virus	Enveloppe	Spécificité des IFITMS	Références
Groupe III (Virus à ARN double brin)	Reoviridae	Réovirus	Non	IFITM3	(Anafu <i>et al.</i> 2013; Danthi <i>et al.</i> 2013)
Groupe IV (Virus à ARN simple brin à polarité positive)	Coronaviridae	Coronavirus SRAS	Oui	Variable en fonction du type cellulaire	(Huang <i>et al.</i> 2011; Inoue <i>et al.</i> 2007)
	Flaviviridae	Dengue Fièvre hémorragique d'Omsk Fièvre jaune Nil Occidental	Oui	IFITM3 > IFITM1 > IFITM2	(Brass <i>et al.</i> 2009b; Jiang <i>et al.</i> 2010; Schoggins <i>et al.</i> 2011; Y. C. Chen, Wang, et King 1999; Zaitseva <i>et al.</i> 2010; Smit <i>et al.</i> 2011; Chan, Huang, et Farzan 2012)
		Hépatite C	Oui	IFITM1 > IFITM2/IFITM3	(C. Wilkins <i>et al.</i> 2013; Narayana <i>et al.</i> 2015)
	Zika	Oui	IFITM3 > IFITM1	(Meertens <i>et al.</i> 2017; Savidis <i>et al.</i> 2016)	
Togaviridae	Sindbis Virus de la forêt de Semliki	Oui	IFITM3 > IFITM2 Pas IFITM1	(Weston <i>et al.</i> 2016)	
Groupe V (Virus à ARN simple brin à polarité négative)	Bunyaviridae	Andes Hantan La Crosse	Oui	IFITM1/IFITM2/IFITM3	(Mudhasani <i>et al.</i> 2013; Hollidge <i>et al.</i> 2012; Arikawa, Takashima, et Hashimoto 1985; McNulty <i>et al.</i> 2013; Jin <i>et al.</i> 2002; McCaughey <i>et al.</i> 1999)
		Fièvre de la Vallée du Rift	Oui	IFITM2/IFITM3 Pas IFITM1	(Mudhasani <i>et al.</i> 2013; Harmon <i>et al.</i> 2012)
	Filoviridae	Ebola Marburg	Oui	IFITM1/IFITM3 (dépend du type cellulaire)	(Huang <i>et al.</i> 2011; Hunt, Lennemann, et Maury 2012; Carette <i>et al.</i> 2011; Côté <i>et al.</i> 2011)
	Orthomyxoviridae	Grippe A	Oui	IFITM3 > IFITM2 > IFITM1	(Brass <i>et al.</i> 2009; Huang <i>et al.</i> 2011; Feeley <i>et al.</i> 2011; Li <i>et al.</i> 2013; W. J. Chen, Goldstein, et Brown 1990; Leung, Basler, et Amarasinghe 2012)
	Rhabdoviridae	VSV (vésiculovirus)	Oui	IFITM1/IFITM3 > IFITM2	(Brass <i>et al.</i> 2009; Li <i>et al.</i> 2013; Mudhasani <i>et al.</i> 2013; Harmon <i>et al.</i> 2012; Weidner <i>et al.</i> 2010; Finkelshtein <i>et al.</i> 2013)
		Rage (Lyssavirus)	Oui	IFITM3 > IFITM2	(Smith <i>et al.</i> 2013; Albertini <i>et al.</i> 2012)
Groupe VI (rétrovirus à ARN simple brin à polarité positive)	Retroviridae	JSRV (bêta rétrovirus)	Oui	IFITM1 > IFITM2/IFITM3 (dépend du type cellulaire)	(Li <i>et al.</i> 2013; Bertrand <i>et al.</i> 2008; Côté, Zheng, et Liu 2009)
		VIH-1 (lentivirus)	Oui	IFITM2/IFITM3 > IFITM1 IFITM3 ne restreint pas l'infection par le VIH-1 dans les cellules TZM-bl et HeLa	(Yu <i>et al.</i> 2015; Tartour <i>et al.</i> 2014; Shi, Schwartz, et Compton 2017)

Tableau 2 : Virus restreints par les protéines IFITMs

Une particularité concerne la protéine IFITM 2 qui agirait de manière très similaire à IFITM 3 mais elle serait un peu moins efficace (**Figure 12**) (Brass *et al.* 2009).

La localisation différente des IFITMs est liée à des domaines protéiques particuliers et influence grandement l'activité antivirale de ceux-ci. Par exemple, pour IFITM-3, la perte des 21 premiers acides aminés dans la région N-Terminale va mimer IFITM 1 et conduire à une relocalisation prononcée de celui-ci à la membrane plasmique de la cellule, l'empêchant ainsi de s'associer avec les compartiments endosomaux et de ce fait d'exercer son activité antivirale dans le cas du VIH (Jia *et al.* 2012). Plus spécifiquement, il a été montré que la mutation dans IFITM-3 des tyrosines Y20 (du motif YXX ϕ) et Y99 remplacées par des alanines ou des acides aspartiques abroge l'activité antivirale dans le cas du virus VIH. Pour IFITM-1, une délétion de 12 acides aminés en région C-Terminale entraîne une perte d'activité antivirale contre le virus HCoV (X. Zhao *et al.* 2018). De même, trois mutations dans les gènes IFITMs 1 et 3 conduisent à perte de restriction et même à une facilitation de l'entrée virale dans les cellules. Les tyrosines en position 20 dans le domaine N-Terminal et celle en position 99 dans la boucle cytosolique si elles subissent des mutations ne seront plus phosphorylées et de ce fait la localisation de ces IFITMs sera modifiée et ils ne pourront plus jouer le rôle inhibiteur de l'entrée du virus HCoV dans la cellule. Enfin, des mutations des phénylalanines en position 75 et 78 dans le domaine transmembranaire 1 vont empêcher l'oligomérisation des protéines IFITMs et vont faciliter l'entrée du virus HCoV dans la cellule (X. Zhao *et al.* 2018).

La vaste majorité des études se sont concentrées sur les IFITMs humains mais plusieurs études montrent également que les IFITMs d'autres espèces ont également une activité antivirale. Les IFITMs des primates non humains ont par exemple été montrés comme ayant une activité antivirale plus forte que leurs orthologues humains sur le VIH-1 et certaines souches de SIV (Simian Immunodeficiency virus), le VIH-2 étant insensible à la restriction par les IFITMs (J. Wilkins *et al.* 2016). Une activité antivirale a aussi été observée avec les IFITMs (principalement IFITM-3) murins (Bailey *et al.* 2012; Everitt *et al.* 2012), aviaires, de cochon ou bien encore de chauve-souris (Benfield *et al.* 2015) contre de nombreux virus comme Chikungunya, Zika, influenza, lyssavirus (Blyth *et al.* 2016; Smith *et al.* 2013; Lanz *et al.* 2015) ou coronavirus (Huang *et al.* 2011). Cependant, le rôle des IFITMs dans la susceptibilité ou la tolérance virale qui peut varier selon les espèces infectées reste à déterminer.

D. Mécanismes d'action des IFITMs

Les IFITMs ont tout d'abord été étudiés pour leur capacité à inhiber le VIH-1 (Lu *et al.* 2011). Ils ont ensuite été démontrés comme facteurs de restriction pour de nombreux virus tels que le virus Influenza A, le virus de la Dengue ou encore le virus Ebola (**Figure 13**) (Perreira *et al.* 2013).

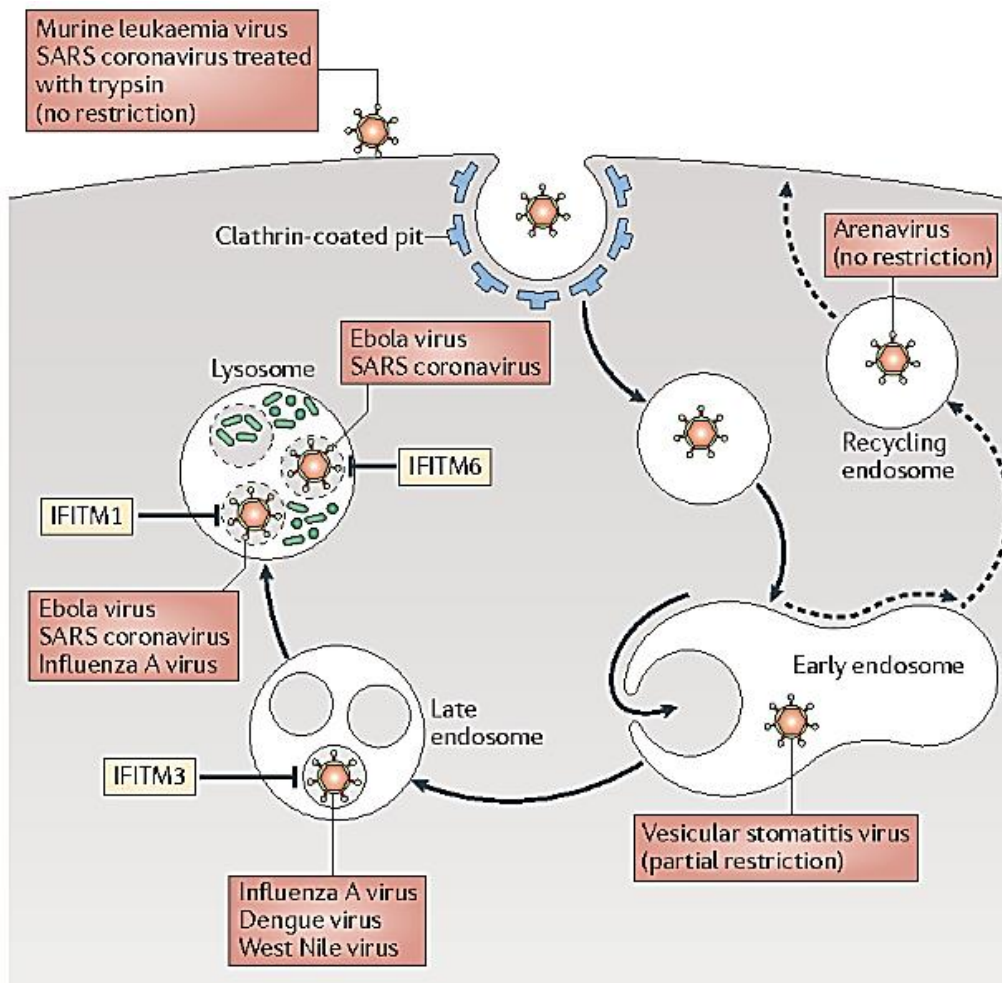


Figure 13 : Mécanismes d'action des IFITMs en fonction du compartiment cellulaire où a lieu la fusion des membranes. L'IFITM3 localisé dans les endosomes tardifs bloque donc la fusion des virus à ce niveau-là, alors que l'IFITM 1 intervient au niveau du lysosome ainsi qu'au niveau des endosomes précoces. L'IFITM2 se comporte de manière similaire à l'IFITM3. L'IFITM 6 d'origine murine est également représentée sur ce schéma et intervient aussi au niveau du lysosome (Diamond et Farzan 2012).

Différentes études se sont intéressées aux mécanismes d'action des IFITMs. Un des modes d'action les plus étudiés a été le mécanisme de fusion virale. En effet, de par leur localisation (membrane plasmique et endosomes précoces / tardifs) et leur capacité à modifier les propriétés physiques des endolysosomes en empêchant leur acidification, les IFITMs peuvent

restreindre soit la fusion avec la membrane cellulaire soit rendre impossible la fusion avec les membranes endosomales. Cette dernière est réalisée en influant sur l'activité des cathepsines, elles-mêmes responsables de l'acidification de ces compartiments, en inhibant cette acidification. De ce fait, le virus restera internalisé jusqu'à sa dégradation dans les autolysosomes (Feeley *et al.* 2011).

Un autre mécanisme d'action décrit pour les IFITMs est la rigidification des membranes endolysosomales en modifiant leur composition lipidique (Amini-Bavil-Olyaei *et al.* 2013) et en interagissant *via* leur domaine transmembranaire TM2 avec VAPA (Vésicules-Associated membrane Protein-associated A). Dans la cellule, lorsqu'une protéine est mal repliée, cela engendre un stress cellulaire et une des fonctions de VAPA va être de ralentir le flux des lipides vers le réticulum endoplasmique et aussi de gérer ce stress en inhibant le contact avec la membrane plasmique. Cette protéine située dans les vésicules intracellulaires s'associe avec la protéine OSBP (Oxysterol Binding Protein) afin de stabiliser le cholestérol dans la cellule (Wyles, McMaster, et Ridgway 2002).

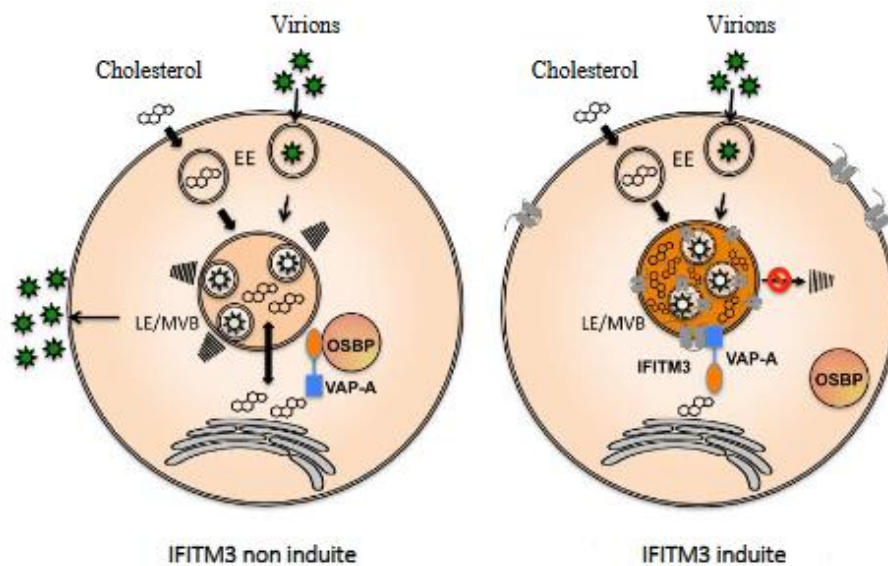


Figure 14 : Modèle d'inhibition de la fusion virale engendrée par l'accumulation de cholestérol au sein des endosomes tardifs («Late Endosomes», LE) et des corps multivésiculaires («Multi Vesicular Bodies», MVB) suite à l'interaction d'IFITM3 avec la protéine VAPA. En l'absence d'induction d'IFITM3 (schéma de gauche), le cholestérol importé dans la cellule est hydrolysé dans les endosomes puis transporté dans le cytosol tandis que le cholestérol synthétisé de novo est lui transporté du réticulum endoplasmique (RE) aux autres organelles dont font partie les endosomes et les lysosomes. Suite à l'induction d'IFITM3 et à son interaction avec VAPA (schéma de droite), le couple VAPA/OSBP ne peut plus contribuer à cette régulation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol. Le cholestérol s'accumule alors au sein des endosomes tardifs (LE) et des corps multivésiculaires (MVB) ayant pour conséquence de bloquer la fusion de la membrane virale avec celle des compartiments LE/MVB ayant lieu en temps normal et empêchant dès lors les particules virales de libérer leur génome ou leur nucléocapside dans le cytosol. EE= «Early Endosomes», endosomes précoces (Amini-Bavil-Olyaei *et al.* 2013).

En altérant la fonction de ces protéines, les IFITMs conduiraient à une accumulation très forte de cholestérol qui rigidifie les membranes lipidiques et inhibe la fusion des membranes virales et endosomales (**Figure 14**). Ce dernier modèle est cependant remis en question par un article montrant que la quantité de cholestérol n'est pas augmentée en présence de IFITM H3 et qu'une augmentation de façon artificiellement du taux de cholestérol ne bloque pas l'entrée virale (Lin *et al.* 2013). Cette étude suggère par ailleurs que la capacité de multimérisation des IFITMs pourrait induire une rigidification membranaire bloquant l'étape de fusion de l'entrée virale. Le mécanisme de restriction induit par IFITM-1 semble quant à lui différent des IFITM-2 et -3 (Lu *et al.* 2011). En effet, IFITM-1 ne bloque pas l'étape d'entrée mais il semble réduire la production des particules virales. En accord avec cette idée il a été observé que les IFITMs sont capables de réduire l'expression des protéines virales du VIH-1 (Chutiwitoonchai *et al.* 2013). Enfin, les IFITMs ne sont pas seulement capables de bloquer l'étape d'entrée des virus. En effet, une étude a démontré qu'une surexpression des protéines IFITMs dans les cellules produisant le virus HIV-1 entraînait une perte d'infectivité des nouveaux virions en s'incorporant aux particules virales nouvellement formées. Ce mécanisme d'action se produit donc aussi lors des étapes tardives du cycle viral, on parle alors de restriction tardive ou de « negative imprinting » (Tartour *et al.* 2014). Le mécanisme par lequel les IFITMs réduisent l'infectivité des particules virales reste à ce jour inconnu. Il pourrait être identique ou similaire à celui de la restriction précoce ou bien agir de façon différente. Dans l'ensemble, les études montrent une capacité des IFITMs à bloquer de nombreuses et différentes étapes du cycle virale (entrée, synthèse protéique, production particules infectieuses) *via* un panel de mécanisme divers et variés. Une question reste cependant en suspend sur la capacité des IFITMs à bloquer ou non un virus donné à toutes ces étapes de son cycle viral ou à seulement certaines d'entre-elles et ce selon les IFITMs, l'espèce considérée et les cellules ciblées.

E. Les antagonistes viraux et l'échappement à la restriction par les IFITMs.

Afin de bloquer la réponse cellulaire antivirale, certains virus comme le RVFV codent pour des protéines virales dans les cellules infectées bloquant la transcription globale de la cellule (NSs) ou comme le virus influenza via sa protéine NS1 inhibe l'expression du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4B (eIF4B) qui est impliqué dans la régulation de la traduction des protéines de la cellule (S. Wang *et al.* 2014). Cette stratégie virale est efficace mais elle ne suffit pas car par exemple les ISGs sont exprimés dans les cellules non infectées suite à l'induction en

trans par l'IFN produit par les cellules infectées adjacentes. Des antagonistes viraux ciblant spécifiquement les ISGs sont dans ce cas requis. A ce jour aucun antagoniste viral direct n'a pu être identifié. Le seul mécanisme d'échappement décrit est celui du VIH capable d'échapper à la restriction des IFITMs humains grâce à des modifications sur la structure de sa protéine d'enveloppe et de sa protéine accessoire Vpu par des mutations permettant au virus d'augmenter sa capacité de réplication pour compenser la restriction (Y. Wang *et al.* 2017; Foster *et al.* 2016; Tartour et Cimarelli 2015). A noter enfin que les IFITMs pourraient aussi favoriser l'entrée de certains virus comme cela a été décrit pour le coronavirus humain OC43 (X. Zhao *et al.* 2014).

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU PROJET

Le système immunitaire inné est essentiel pour la production rapide d'IFN-I et de cytokines et il constitue la première ligne de défense contre les infections virales chez les mammifères. L'activation de ces voies induit l'expression de plusieurs facteurs de restriction tels que les IFITMs qui sont capables de bloquer un large panel d'infections virales. Une caractéristique des IFITMs est de bloquer à deux étapes du cycle viral : i) précocement, en inhibant l'entrée du virus et plus spécifiquement sa libération dans le cytosol et ii) tardivement, en diminuant la capacité infectieuse des virus nouvellement produits par des cellules exprimant les IFITMs. Une précédente étude a montré que le RVFV est sensible à la restriction précoce induite par les IFITM-2 et -3 humains (Mudhasani *et al.* 2013) mais la capacité de ces IFITMs à bloquer précocement l'étape d'entrée du RVFV et/ou tardivement en diminuant l'infectivité des particules virales restent inconnues. D'autre part, le RVFV est un virus zoonotique qui infecte naturellement plusieurs espèces mammifères avec des manifestations cliniques très variables allant d'une forte mortalité chez les ovins et bovins à une absence de symptômes chez le chameau. En plus des IFITMs humains, l'activité antivirale des IFITMs de ces autres espèces reste donc à déterminer. Considérant ces questions qui restent sans réponse et afin de mieux comprendre les interactions entre le RVFV et les IFITMs, mon projet de recherche a eu pour objectif: i) de déterminer si les IFITMs humains induisent une activité antivirale contre le RVFV aux étapes tardives de son cycle viral c'est-à-dire en diminuant l'infectiosité des particules

virales produites et ii) de tester l'activité antivirale des IFITMs d'autres espèces naturellement infectées par le RVFV (bovins, camélidés) et les comparer à celles induites par les IFITMs humains.

MATERIELS ET METHODES

CULTURE CELLULAIRE

Les cellules HEK 293T (cellules embryonnaires de rein humain), Vero E6 (cellules de rein adulte singe vert africain), BSR (clone issu des cellules rénales de bébé hamster), BSR T7 (même cellules que précédemment mais exprimant la polymérase T7) ont été utilisées. Toutes les cellules ont été maintenues en culture avec du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF, Hyclone Research Grade FBS, South American Origin, GE HEALTHCARE, USA) et 1% de Pénicilline-Streptomycine (P/S, 10 000 U/ml Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA). Toutes les cultures ont été faites à 37°C et 5% de CO₂.

PLASMIDES D'EXPRESSION

Les plasmides d'expression des IFITM humain 1 (H1), IFITM humain 2 (H2), IFITM humain 3 (H3), IFITM bovin 1 (B1), IFITM bovin 1-like (B1-like), IFITM bovin 3 (B3) et IFITM dromadaire 1 (C1), IFITM dromadaire 1-like (C1-like), IFITM dromadaire 3 (C3) ont été utilisés pour exprimer les différents IFITMs. Tous les IFITMs ont été étiquetés soit à l'aide d'une étiquette Hémagglutinine (HA) soit avec une étiquette Flag toutes deux fusionnées en N-terminal. Le plasmide vide pcDNA a été utilisé comme contrôle négatif. Tous les plasmides nous ont été gracieusement donnés par le Dr. Andrea Cimorelli et ont été décrits précédemment (Tartour *et al.* 2014).

TRANSFECTION DES IFITMs ET INFECTION VIRALE

Expérience de restriction tardive avec la souche MP12.

Les cellules 293T ont étéensemencées à 3×10^6 dans des boîtes de 10 cm. Deux jours après les cellules ont été transfectées avec 12 μg de pcDNA 3.1 ou avec IFITMs H1, H2 et H3 exprimant l'étiquette Flag ou H3 sans étiquette (H3WT) en utilisant du Turbofect (ThermoFisher) et en suivant les instructions de la compagnie. 4 heures après transfection, les cellules ont été infectées à une MOI (multiplicity of infection) de 1 avec la souche RVFV-MP12 fournie par le Dr Philippe Marianneau. Le stock initial utilisé dans cette étude a été répliqué sur les cellules VeroE6 et titré par la méthode de titration virale en PFU. (Plaque Forming Unit). 2h après l'infection, l'inoculum viral est remplacé par 10 ml de milieu DMEM frais. Les surnageants sont récupérés et clarifiés par une étape de centrifugation et 500 μl sont stockés à -80°C pour la cytométrie, 140 μl sont directement utilisés pour une extraction d'ARN et le reste du surnageant est filtré sur une membrane de 0,45 μm avant d'être ultra-centrifugés à 110 000 g pendant 2h à $+4^\circ\text{C}$ sur un coussin de sucrose. Les culots viraux sont resuspendus dans 60 μl de DPBS 1X et les cellules sont collectées dans 800 μl de tampon RIPA complétementé avec un cocktail inhibiteur de protéase. (Roche). Les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 10 min à 1000 g afin d'enlever les débris cellulaires. Chaque expérience a été réalisée 3 fois de façon indépendante.

Expérience d'infection avec une souche virulente.

Les cellules HEK 293T ont étéensemencées en plaque 12 puits à $2,5 \times 10^5$ cellules par puit. 24h après ensemencement, les cellules ont été transfectées avec 0,5 μg des plasmides d'expression IFITM H1, H2, H3, B1, B2, B3, C1, C2, C3 et du plasmide pcDNA. La transfection a été réalisée avec 2 μl de Lipofectamine 2 000 (Invitrogen by life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA) dans un volume final de 100 μL d'OptiMEM (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, USA) et les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO_2 . 6 heures après le début de la transfection, 1 ml de milieu de culture a été ajouté dans chaque puit et les cellules ont été remises en incubation.

24h après, les cellules 293T ont été infectées avec la souche virulente ZH548, conservée à -80°C et amplifiée sur VeroE6. L'infection se fait à une MOI de 0,001 dans 500 μl de milieu DMEM supplétementé avec 4 % de SVF et 1% de P/S. 100 μL de cet inoculum ont été conservés pour être

titrés par TCID50 a posteriori. Après 2h d'incubation à 37°C et 5% CO₂, un lavage a été réalisé et 600 µL milieu de culture ont été rajoutés. 100 µL de ce milieu ont été conservés comme contrôle du lavage (T+2h) pour être titré par TCID50 a posteriori. Après 24h ou 48h d'infection, le surnageant de culture a été récupéré pour titration du virus par TCID50. Les cellules ont été détachées par traitement à la trypsine Trypsine-EDTA 0,05 % 1X (200 µL GIBCO, Thermo Fisher Scientific, USA) et fixée dans 400 µL de paraformaldéhyde 1% (PFA, Santa Cruz, Clinisciences, France) ou lysées avec 200 µL de tampon Laemmli 1X (Alfa Aesar™, Fisher Scientific, USA) chauffé à 95°C pendant 10 minutes.

TITRATION VIRALE PAR TCID50 :

La quantité de virus infectieux présent dans le surnageant de culture cellulaire a été titré en déterminant la dose infectieuse médiane de culture cellulaire (Tissue Culture Infectious Dose 50, TCID50). Les surnageants de culture ont été, dans un premier temps, dilués par dilution en cascade de raison 10, de 10⁻¹ à 10⁻¹¹, dans 100 µL de milieu DMEM 4% SVF 1% P/S, en plaque 96 puits. Dans un second temps, 8x10³ BSR T7 dans 100 µL de milieu DMEM 4% SVF 1% P/S ont été rajoutées dans chacun des puits. Les plaques de titration ont ensuite été incubées 5 jours à 37°C et 5% CO₂ avant de déterminer les puits présentant des effets cytopathiques caractéristiques d'une infection par RVFV. Le titre en TCID50/ml a ensuite été déterminé selon la méthode de Reed and Muench (Lindenbach 2009).

ANALYSE DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT :

Les lysats cellulaires en tampon Laemmli ont été chauffés à 95°C pendant 10 min avant d'être séparées sur un gel 12% d'acrylamide-polyacrylamide par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans Blot Turbo RTA transfert kit midi, BioRad, USA) ou PVDF (polyvinyl difluoride, BioRad, USA) . Après blocage dans du TBS-Tween 20 0,1 % 5% de lait, les membranes ont été marquées comme détaillées ci-dessous.

Expérience de restriction tardive avec la souche MP12.

L'incubation de l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la protéine N RVFV (1/5000^e) a été réalisée sur la nuit à + 4 °C, tout comme l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre Gn RVFV (1/500^e). La détection de la présence de l'étiquette Flag, afin de révéler les IFITMs a été réalisée par l'anticorps couplé HRP (Horse Radish Peroxydase) A8592 (1/7500^e, Sigma-Aldrich) et un contrôle de charge avec l'actine a été réalisé à l'aide de l'anticorps de souris couplé à la HRP A3854 (1/75000^e Sigma-Aldrich, MERCK, Allemagne). Respectivement, après l'incubation avec les anticorps contre N et Gn de RVFV, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire soit dirigé contre le lapin (Goat Anti-Rabbit IgG A6154, 1/5000^e; ou bien contre la souris (Sheep Anti-Mouse IgG A5906, 1/10000^e, Sigma-Aldrich, MERCK, Allemagne) couplés à la HRP.

Les protéines ont été visualisées par chemiluminescence (SuperSignal West Pico Substrate (Thermo Scientific) et après exposition un film autoradiographique a été développé (Blue Devil Interleaved, Genesee Scientific).

Expérience d'infection avec une souche virulente.

N RVFV a été détectée avec un anticorps primaire de lapin (1/5000^e) et l'étiquette HA des IFITMs avec un anticorps primaire de souris (A130275, 1/5000^e, Abcam, Royaume-Uni). Les protéines ont été révélées avec les anticorps secondaires appropriés (Goat Anti-Rabbit IgG A6154, 1/5000^e; Sheep Anti-Mouse IgG A5906, 1/10000^e, Sigma-Aldrich, MERCK, Allemagne) couplés à la Horse Radish Peroxydase (HRP). Un contrôle de charge avec l'actine a été détecté à l'aide d'un anticorps de souris couplé à la HRP (A3854, 1/75000^e Sigma-Aldrich, MERCK, Allemagne).

Les protéines ont été visualisées par chemiluminescence (Clarity, BioRad, USA) en utilisant l'appareil ChemiDoc, (BioRad, USA). Enfin les images ont été analysées à l'aide du logiciel Image Lab (BioRad, USA).

RT-qPCR

Les ARNs du virus RVFV ont été extraits à partir de 140 µl de chaque surnageant avec le kit d'extraction QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Le même volume correspondant à environ 1 µg d'ARN de chaque échantillon a été utilisé afin d'obtenir les ADN complémentaires en utilisant un kit de transcription inverse iScript™ advanced cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Ensuite, 1 µl de chaque ADNc dilué 2000 fois a été utilisé pour quantifier grâce au kit de qPCR FastStart Universal SYBR Green Master kit (Roche) la réplication du virus produit en présence des IFITMs en utilisant les primers suivants ciblant l'ADN complémentaire du segment M du RVFV (Fwd : aaaggaacaatggactctggtca; Rev: cacttcttactaccatgtcctccaat) (Drosten *et al.* 2002). La même expérience de RT-qPCR a été réalisée en parallèle sur des ARN provenant du stock viral RVFV MP12 utilisé lors de l'infection. Ces échantillons eux-mêmes dilués 20 fois nous ont permis d'obtenir une gamme viral standard. Chaque réaction de qPCR a été faite en triplicat et les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel NCSS9 avec le test Kruskal-Wallis.

TEST DE REINFECTION ET ANALYSES PAR CYTOMETRIE

Les cellules 293T ont étéensemencées à $0,8 \times 10^5$ dans des plaques de 24 puits. 2 jours après, les surnageants des virus produits sur les 293T infectées précédemment et exprimant les IFITMs ou le plasmide contrôle pcDNA 3.1 et normalisés par rapport aux résultats de qPCR ont servi à infecter ces 293T naïves (volume final de 500 µl). Après une incubation de 6h, les cellules ont été fixées, perméabilisées en Saponine et marquées en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin dirigé soit contre la protéine NSs de RVFV (RVFV Anti-NSs ; 1/500^e) ou bien soit contre la nucléoprotéine N de RVFV (RVFV anti-N ; 1/500^e) fournis généreusement par Richard Elliott. L'anticorps secondaire utilisé est Alexa Fluor 488 anti-lapin au 1/500^e. Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux sur le FACS Calibur (BD Biosciences) afin de quantifier le pourcentage de cellules positives RVFV et ce en utilisant les valeurs obtenues avec le témoin ou avec le virus inactivé par les radiations UV.(3x15W; 254 nm ; distance de 5 cm pendant 40 secondes) déterminés comme seuil.

Le pourcentage des cellules infectés par RVFV produit en présence du contrôle pcDNA a été arbitrairement assigné à la valeur de 100 % afin de pouvoir comparer les échantillons en

présence des différents IFITMs. Ces expériences ont été réalisées en triplicat et les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel NCS9 avec le test Kruskal-Wallis.

MARQUAGE IMMUNOFLUORESCENT DES IFITMs ET DU VIRUS ET ANALYSES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Les cellules fixées ont été perméabilisées à l'aide d'une solution de DPBS 0,1% Saponine (Sigma-Aldrich, MERCK, Allemagne) 10 % SVF. Pour le marquage du virus, l'anticorps de lapin dirigé contre la nucléoprotéine de RVFV et pour détecter les IFITMs l'anticorps primaire de souris (A130275, 1/5000^e, Abcam, Royaume-Uni) dirigé contre l'étiquette HA. Les anticorps secondaires utilisés ont été respectivement Alexa Fluor 488(A11034 Life technologies Thermo Fisher Scientific, USA) et l'anticorps anticorps de souris couplé au Pe-Cy7 (ab130790, Abcam, Royaume-Uni). Les anticorps primaires ont été incubés pendant 2h 30 à 4°C. Les anticorps secondaires ont été incubés 1 heure à 37°C. Toutes les solutions d'anticorps ont été dilués (1:1000) en PBS 0,1% Saponine 10 % SVF. Les cellules ont ensuite été analysées en utilisant le cytomètre LSR II (Becton Dickinson BD USA). L'acquisition et l'analyse des données ont été faites à partir du logiciel BD FACSDiva™ (Becton Dickinson BD USA).

RESULTATS

I. Résistance du RVFV à la restriction tardive induite par les IFITMs

En 2014, l'équipe d'Andrea Cimorelli (CIRI-Lyon) a montré que les IFITMs étaient incorporés dans les particules virales du VIH et qu'ils avaient un effet antiviral sur la phase tardive du cycle de réplication virale en diminuant l'infectivité des nouveaux virions VIH produites dans des cellules humaines exprimant les IFITMs (Tartour *et al.* 2014). Suite à cette étude, nous avons été sollicités par Andrea Cimorelli pour notre expertise sur le RVFV dans le cadre d'un projet collaboratif plus large visant à étudier la capacité des IFITMs à bloquer cette phase tardive (i.e. de réduire l'infectivité des particules virales nouvellement produites) de virus de diverses familles. J'ai donc réalisé cette étude en me concentrant sur le RVFV et en utilisant la souche virale atténuée appelée MP12.

A. Production de stocks viraux de RVFV sur des cellules exprimant ou non les IFITMs humains.

Afin de déterminer l'impact des IFITMs sur la capacité infectieuse des particules virales de RVFV, j'ai généré des stocks viraux à partir de cellules transfectées ou non par les IFITM H1, H2 et H3. La transfection des plasmides exprimant les IFITMs puis l'infection par RVFV se sont l'une derrière l'autre afin d'éviter le blocage précoce de l'infection par les IFITMs humains et d'analyser uniquement l'effet en phase tardive c'est-à-dire sur l'infectivité des particules virales nouvellement produites. Afin de vérifier la production des virus et l'expression des IFITMs des analyses par western blot ont été réalisées sur les surnageants viraux et les lysats cellulaires.

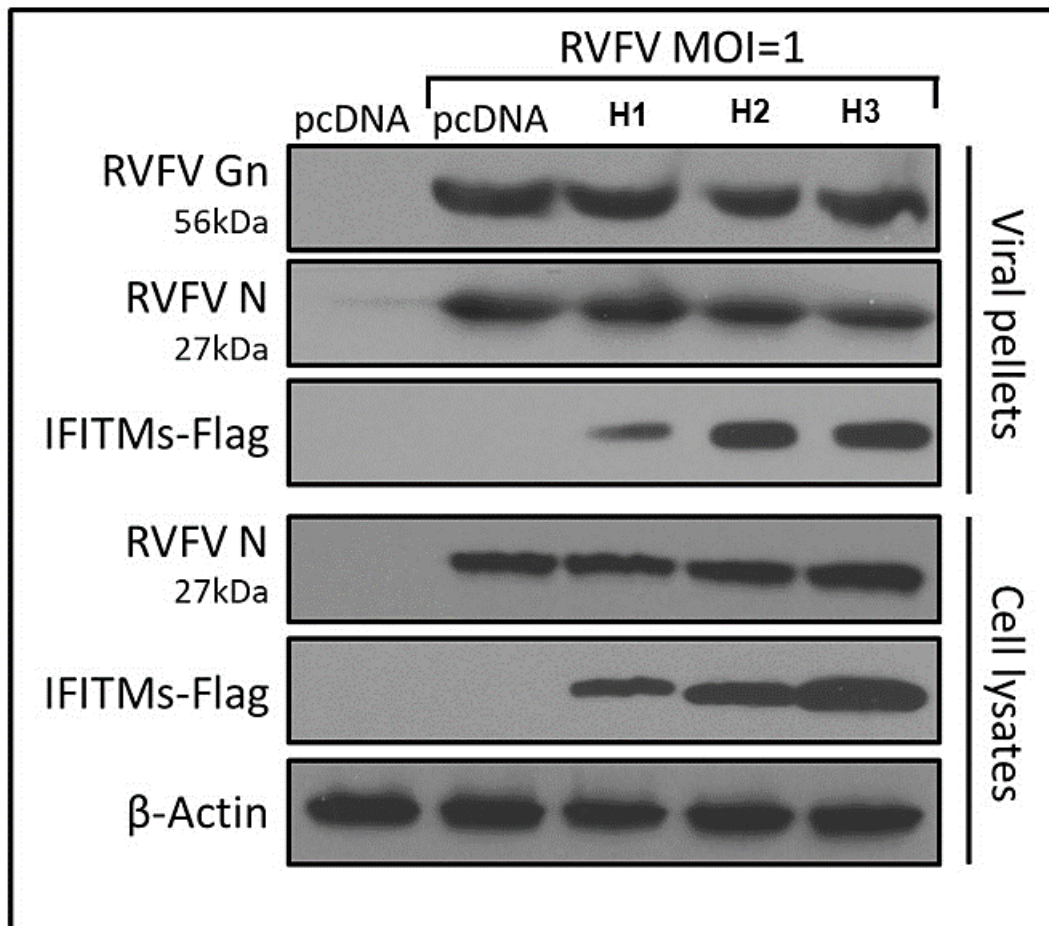


Figure 15 : Analyse de la production virale et de l'expression des IFITMs humains. H1, H2, et H3 sont les IFITMs humains, pcDNA est le contrôle. Les cellules ont été infectées avec la souche RVFV-MP12 à une MOI de 1 (Multiplicity of Infection). Les surnageants de culture centrifugés « Viral pellets » et les lysats cellulaires « cell lysates » ont été analysés par western blot avec des anticorps ciblant Gn-RVFV (56 kDa), N-RVFV (27 kDa) et Anti-Flag pour détecter l'expression des IFITMs étiquetés (17kDa). Un contrôle de charge a été réalisé en utilisant l'anticorps anti- β -Actin (42 kDa).

Comme observé sur la **figure 15**, les IFITMs humains sont bien exprimés dans les cellules productrices et l'on peut détecter la protéine N du RVFV à des niveaux comparables dans les cellules infectées (Cell lysates) suggérant une absence d'effet des IFITMs sur la réplication du RVFV. H1 semble néanmoins être présent en quantité plus faible que H2 et H3 avec un contrôle de charge β -Actin comparable. L'analyse des surnageants viraux montrent une production efficace de particules virales de RVFV et comparable entre les différentes conditions que ce soit avec le marquage anti-N ou anti-Gn. Cette dernière observation suggère que les IFITMs n'ont également pas d'impact dans ces conditions expérimentales sur la production des particules virales. La précédente étude de l'équipe d'Andrea Cimarelli a montré que les IFITMs co-sédimentent avec les particules virales du surnageant du VIH (Tartour *et al.* 2014). Comme

pour le VIH, les trois IFITMs humains co-sédimentent avec les particules virales de RVFV, H1 étant toujours présent en plus faible quantité.

B. Mise en place du test d'infectivité pour étudier l'activité antivirale tardive des IFITMs humains sur le RVFV

Une fois ces stocks viraux produits et vérifiés par western blot, l'objectif fut de réaliser des infections avec ces virus avec le même nombre de particules virales physiques et ce sur des cellules n'exprimant pas les IFITMs afin de mesurer d'éventuelles différences d'infectivité. Pour obtenir un titre physique de mes stocks viraux, j'ai réalisé pour chacun d'eux des RT-qPCR en ciblant le Seg-M du génome viral ARN. Dans un premier temps, j'ai réalisé une gamme standard avec le RVFV-MP12 afin de vérifier l'efficacité du protocole de RT-qPCR (**Figure 16A**). Comme présenté sur la **figure 16A**, le coefficient de corrélation R^2 est proche de 1 permettant de dire que la dilution virale est bien linéaire et que la méthodologie de RT-qPCR est efficace et adaptée.

Les ARN viraux ont donc ensuite été extraits et des RT-qPCR ont été réalisés à partir de chaque stock. Comme présenté sur la figure 16B, les valeurs Cq sont extrêmement proches (entre 21 et 22 Cq) et aucune différence significative (Kruskal-Wallis $p > 0.05$) n'est observée entre les différents stocks viraux produits sur cellules transfectées par un plasmide pcDNA vide ou exprimant les différents IFITMs (**Figure 16B**). Ces résultats montrent donc qu'il n'y a pas de différence significative en terme de titre physique entre les différents surnageants et qu'il est possible de mener les tests d'infectivité sans avoir à ajuster le titre physique pour normaliser la quantité de virus. Ces résultats indiquent aussi que les IFITMs n'ont pas eu d'impact significatif sur la production de particules virales ce qui était l'objectif en couplant transfection et infection pour éviter l'effet antiviral précoce des IFITMs.

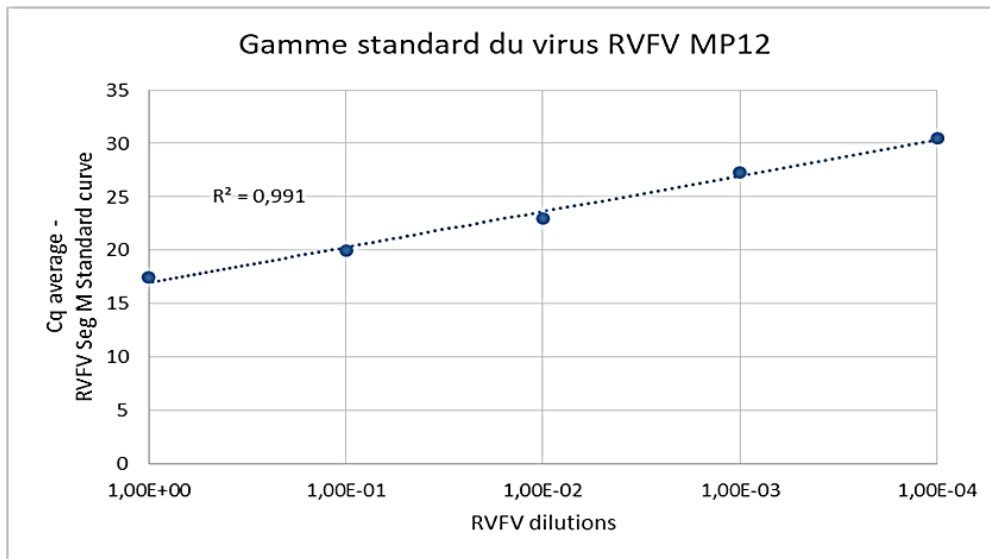
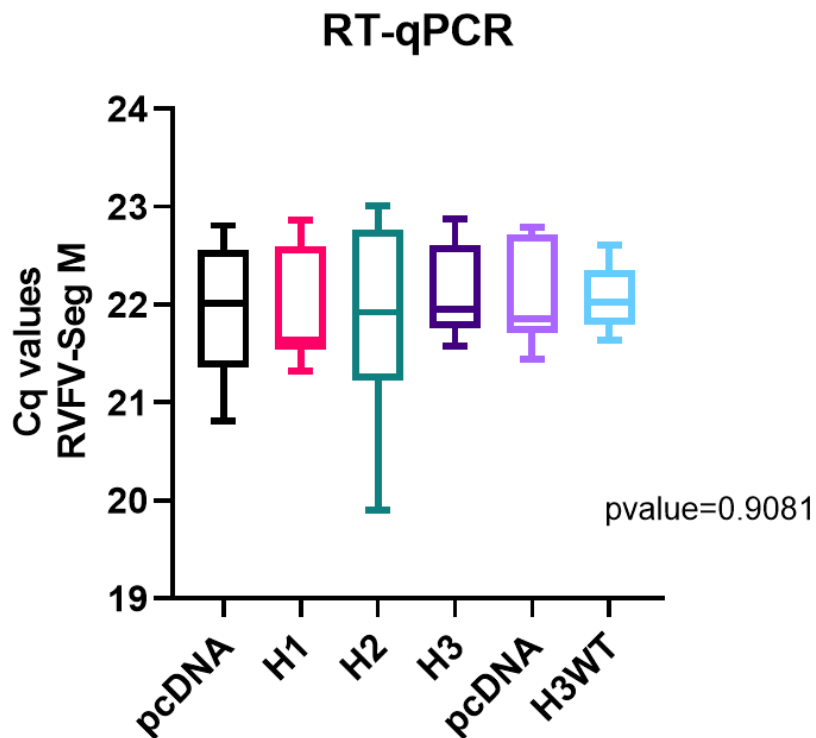
A**B**

Figure 16 : Test d'infectivité des cellules 293T par la souche RVFV-MP12. **A.** Gamme standard du virus RVFV-MP12. Le virus RVFV MP12 a été dilué de 10 en 10 pour obtenir une gamme du virus. Le coefficient de corrélation R^2 est proche de 1 permettant de dire que la dilution virale est bien linéaire. **B.** Titration physique des stocks viraux par **RT-qPCR**. Les surnageants viraux récoltés 24h post infection à partir de cellules infectées et exprimant ou non les IFITMs humains ont été analysés par RT-qPCR en ciblant le Seg-M du RVFV. En plus des IFITMs H1, H2 et H3 et du plasmide contrôle pcDNA, un plasmide exprimant l'IFITM 3 non étiqueté (H3WT) ont été utilisés. Les valeurs Cq issus de trois expériences indépendantes réalisées elle-même en triplicat sont présentées. (Kruskal-Wallis $p > 0.05$)

C. Les IFITMs humains ne diminuent pas l'infectivité des particules virales RVFV

Afin de tester l'infectivité des surnageants, des cellules 293T n'exprimant pas les IFITMs humains ont donc été infectées avec les différents stocks viraux puis analysées à des temps précoces après infection (6h post-infection) par cytométrie en flux en marquant la nucléoprotéine N ou la protéine non structurale NSs du RVFV. L'analyse à ce temps précoce de 6h permet d'exclure une réinfection par toutes nouvelles particules virales produites sur ces cellules après un cycle de réplication du virus et nous permet de voir les étapes d'entrée des particules virales produites en présence ou en absence des IFITMs et leurs effets restrictifs ou non sur ces étapes.

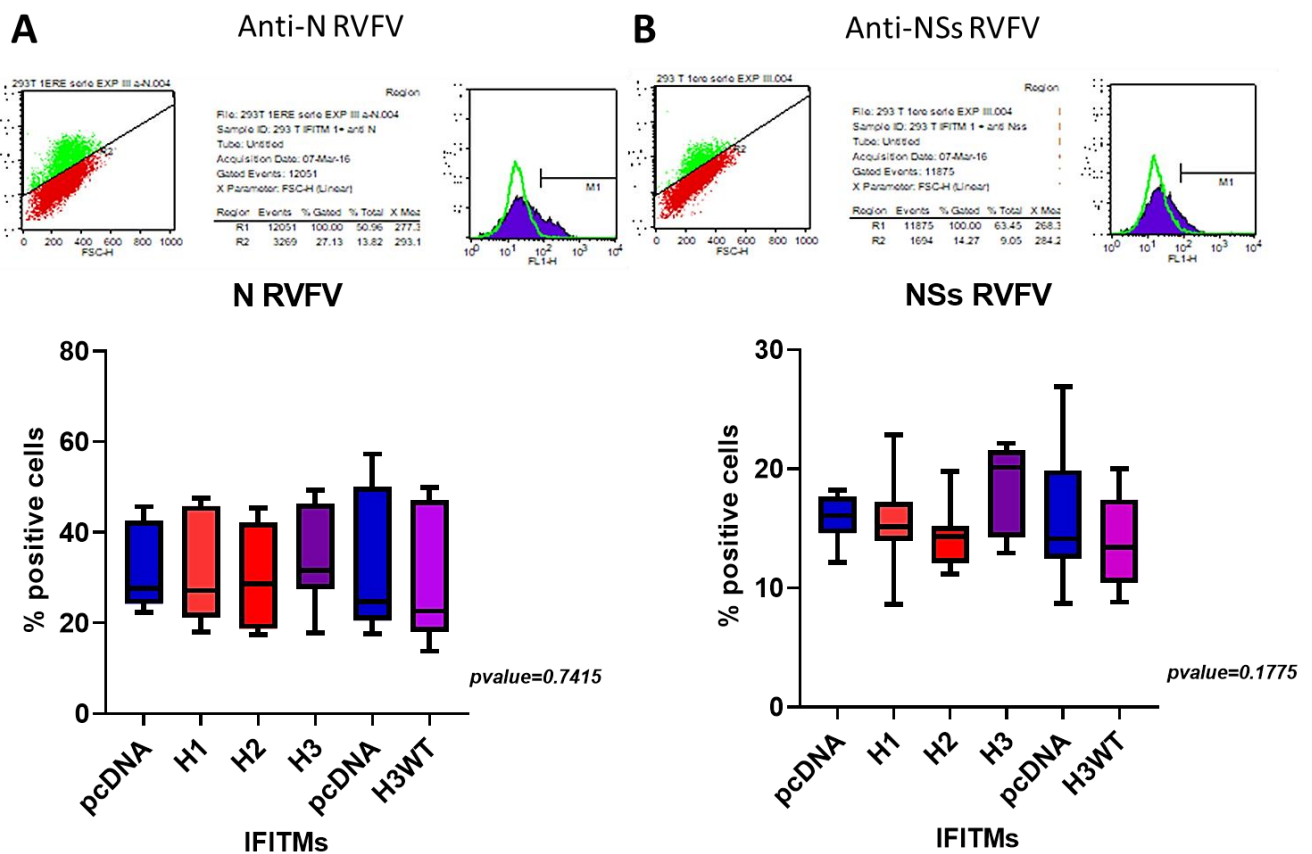


Figure 17 : Test d'infectivité des particules virales de RVFV. Des cellules 293T ont été infectées avec différents stocks viraux produits ou non à partir de cellules exprimant les IFITMs humains. 6h post-infection, les cellules ont été fixées puis marquées afin de détecter les protéines virales N et NSs. Un exemple de graphiques en « Dot Plot » ou Histogramme permettant de voir le pourcentage de cellules infectées après marquage des cellules avec Anti-N (A) ou Anti-NSs (B) Les graphiques représentent la synthèse des données issues de trois expériences indépendantes chacune réalisées en triplicat. Une analyse statistique des résultats a été réalisée par un test Kruskal et Wallis et les p values sont indiquées en bas à droite de chaque graphique.

On observe avec les marquages anti-N et anti-NSs des pourcentages corrects de cellules positives (donc infectées) d'environ 30% et 15% respectivement (Fig. 17A et B). De plus, on constate qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes conditions (Test Kruskal et Wallis ; $pvalue > 0.05$). Ces résultats montrent donc que les IFITMs n'ont pas d'effet sur l'infectivité des particules virales de RVFV.

II. Effet des IFITMs de diverses espèces sur la souche virulente RVFV-ZH548

Après avoir montré que la souche RVFV-MP12 (souche atténuée) était résistante à la restriction tardive induite par les IFITMs humains, je me suis intéressée dans une seconde partie à l'effet des IFITMs d'autres espèces que l'homme sur RVFV et en particulier aux IFITMs bovins et camélidés.

A. Alignement des séquences protéines des différents IFITMS utilisés

Les plasmides exprimant les différents IFITMs humains, bovins et camélidés ont été séquencés puis comparés sur les bases de données Genbank et SwissProt. L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) et les données obtenues sont présentées ci-dessous dans la **figure 18**.

Les IFITMs 1 ou 1-like ont bien la partie N-terminale tronquée par rapport aux IFITMs 2 et 3 et ce pour chaque espèce. Les IFITMs 2 et 3 possèdent bien le motif YEML.



Figure 18 : Alignement des séquences protéiques des plasmides IFITMs humains, bovins et camélidés utilisés. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA.

B. Effet des IFITMs sur la réplication virale de la souche ZH548

Afin d'apporter plus de pertinence à cette deuxième partie et ayant obtenu les autorisations nécessaires de l'agence de sécurité du médicament nous avons choisi d'utiliser la souche RVFV-ZH548 qui est une souche virale pathogène de référence. Pour cette étude, des cellules humaines 293T ont été transfectées avec les plasmides exprimant les différents IFITMs puis infectées 24h après avec la ZH548. Ces conditions d'expérimentation permettent d'analyser globalement l'effet de restriction des IFITMs mais sans discerner l'effet précoce et tardif. Les surnageants de culture ont ensuite été titrés à 24h ou à 48h pour déterminer les titres infectieux et les lysats cellulaires ont été analysés par western blot pour estimer l'expression et la quantité des protéines. Enfin, le pourcentage de cellules infectées à 48h a été mesuré par cytométrie en flux.

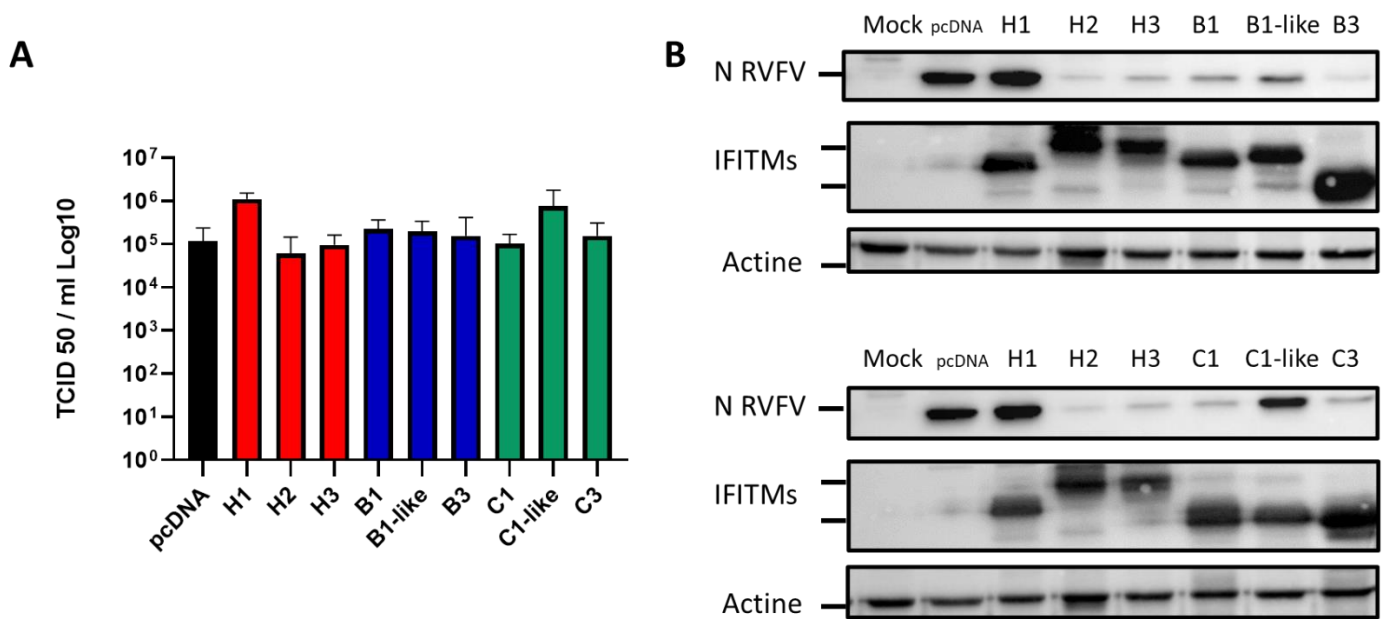


Figure 19 : Effet des IFITMs sur le RVFV 24h post-infection. **A.** Titres infectieux 24h post-infection du RVFV-ZH548 en présence ou non (pcDNA) des IFITMs issus de différentes espèces : « H » : humain, « B » : bovin et « C » : chameau. Les titres infectieux sont indiqués en TCID50/ml et représentent la moyenne de trois répliquats techniques. **B.** Analyse de l'expression des différentes protéines virales et cellulaires par Western Blot à 24h post-infection. Les lysats des cellules infectées ont été déposés sur un gel SDS-PAGE puis ils ont été marqués par les anticorps suivants N-RVFV (27 kDa) et Anti-HA pour détecter l'expression des IFITMs. Un contrôle de charge a été réalisé en utilisant l'anticorps β -Actine (42 kDa).

Sur la **figure 19**, à 24h post-infection, on observe des titres infectieux d'au moins 10^5 logs pour le témoin (pcDNA) ainsi qu'en présence des IFITMs. La seule différence observée par rapport au contrôle est le plus fort titres infectieux (10^6) en présence de H1 et C1-like (**Figure 19A**). Bien que n'ayant pas d'effet observable de restriction sur les titres infectieux à 24h post-infection, par western blot nous pouvons une diminution significative de la quantité de nucléoprotéine de RVFV dans les cellules en présence de tous les IFITMs sauf H1 et C1-like qui sont néanmoins bien exprimés dans les cellules (**Figure 19B**). Ces données montrent donc que les IFITMs H2, H3, C1 et C3 ont une activité de restriction sur le RVFV à 24h pi. contrairement aux IFITMs H1 et C1-like qui n'ont pas d'effet voir même semble promouvoir l'infection comme H1 avec un titre et une quantité de protéine plus importante que par rapport au contrôle (**Figure 19 A et B**).

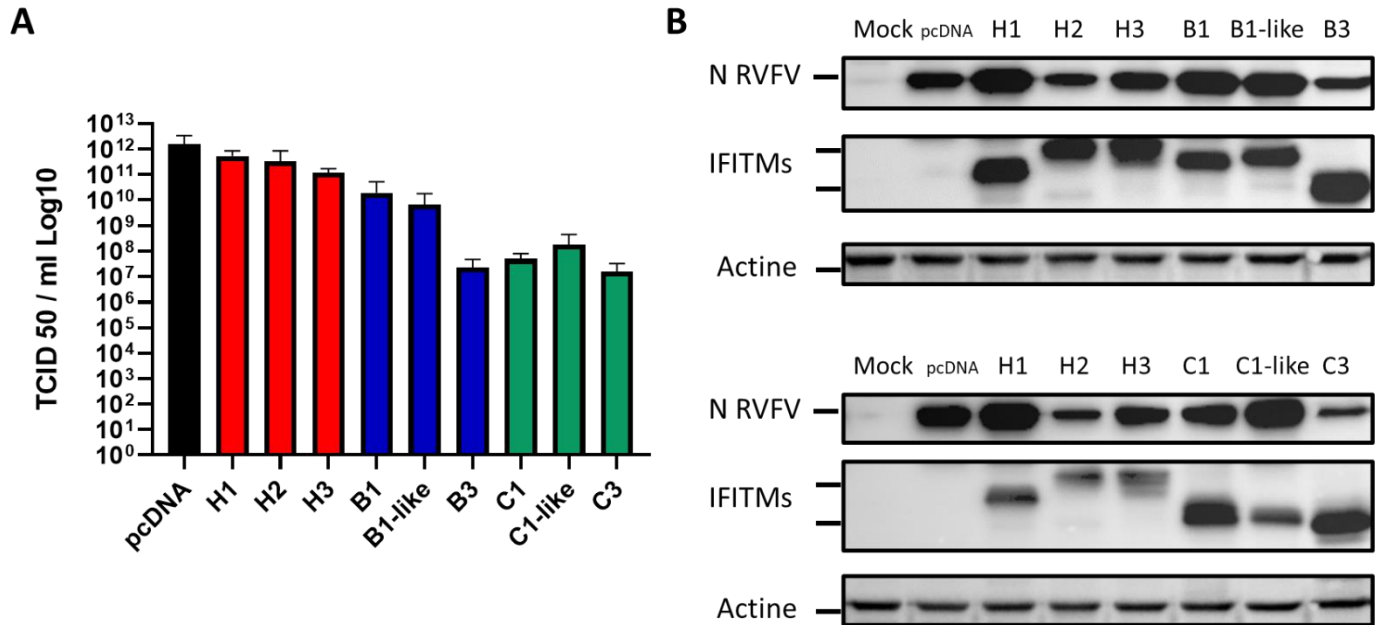


Figure 20 : Effet des IFITMs sur le RVFV 48h post-infection. A. Titres infectieux 48h post-infection du RVFV-ZH548 en présence ou non (pcDNA) des IFITMs issus de différentes espèces : « H » : humain, « B » : bovin et « C » : chameau. Les titres infectieux sont indiqués en TCID50/ml et représentent la moyenne de trois répliquât techniques. **B.** Analyse de l'expression des différentes protéines virales et cellulaires par Western Blot à 48h post-infection. Les lysats des cellules infectées ont été déposés sur un gel SDS-PAGE puis ils ont été marqués par les anticorps suivants N-RVFV (27 kDa) et Anti-HA pour détecter l'expression des IFITMs. Un contrôle de charge a été réalisé en utilisant l'anticorps β -Actin (42 kDa).

A 48h post-infection, on observe des titres infectieux beaucoup plus fort ce qui est attendu et deux différences notables avec des titres infectieux de 2log plus faible pour les IFITMs B1 et B1-like et de 4log plus bas pour mes IFITMs B3, C1, C1-like et C3 (**Figure 20A**). Par western blot, Seuls les IFITMs H2, B3 et C3 présente une quantité plus faible de protéine N RVFV par rapport aux contrôle pcDNA (**Figure 20B**). Notons également que de manière comparable à ce qui est observé à 24h les IFITMs H1 et C1-like présente une quantité plus importante de protéine N-RVFV que le contrôle (**Figure 20B**).

Le pourcentage de cellules infectées à 48h post-infection a été déterminé par cytométrie en flux. Comme présenté sur la **figure 21**, les données montrent la même tendance observée précédemment avec l'analyse des titres et/ou par western blot avec un pourcentage de cellules infectées plus faible (entre 5 et 15%) pour H2 et H3, B3 et C3 par rapport au contrôle qui est à environ 30% de cellules infectées. Enfin, le pourcentage de cellules infectées en présence de H1 est beaucoup plus fort que celui du contrôle (55% vs 30%).

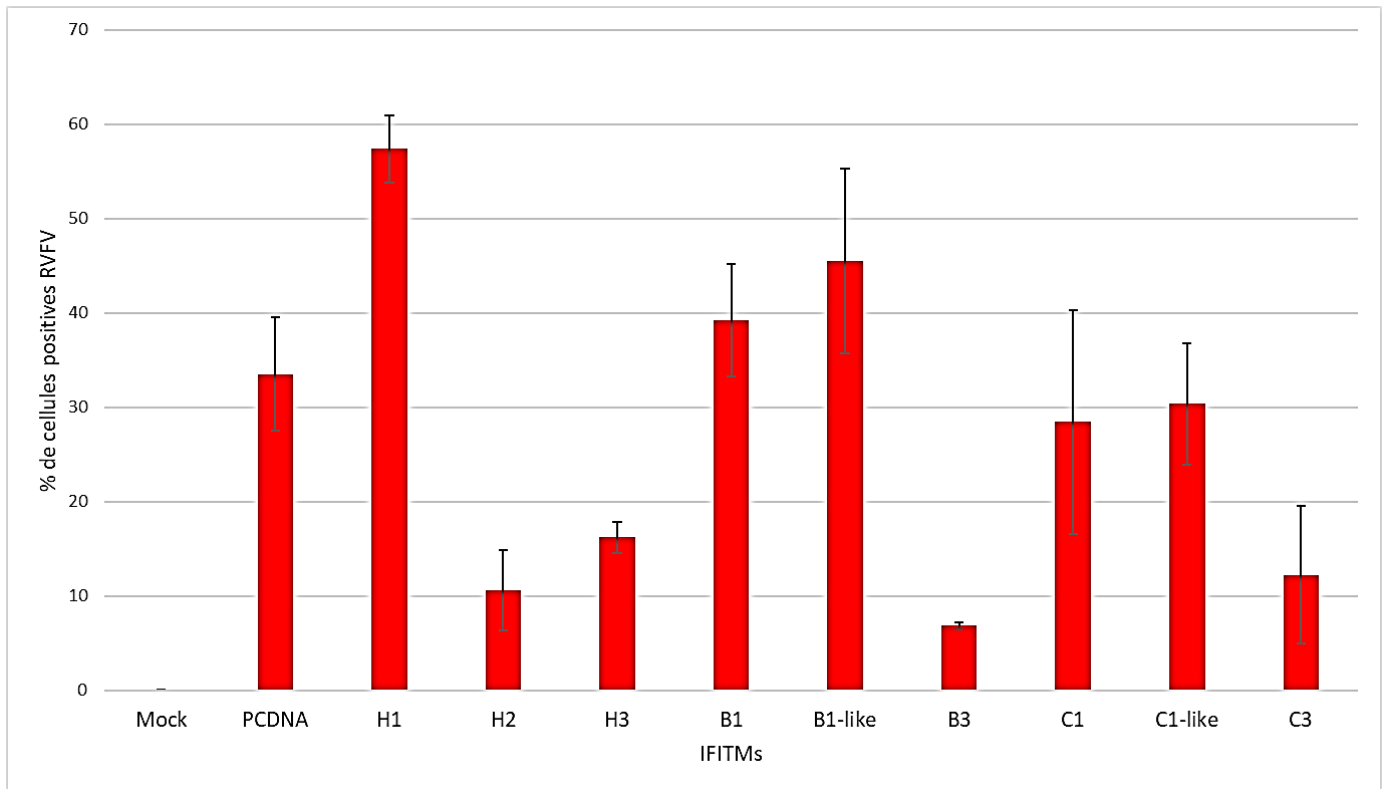


Figure 21 : Quantification par cytométrie de flux du pourcentage de cellules infectées par RVFV. Les cellules ont été récupérées, fixées et perméabilisées afin d'effectuer un marquage immuno-fluorescent grâce à l'anticorps Anti-N RVFV pour quantifier le pourcentage de cellules infectées par RVFV à 48h post-infection. Les quantifications sont issues de la moyenne de trois répliquât techniques d'une expérience.

L'ensemble de ces données sont issues d'une seule expérience qui devra être reproduite *a minima* deux fois pour pouvoir conclure définitivement. Néanmoins, on remarque que selon les IFITMs et le stade d'infection les effets varient avec le temps et selon l'analyse considérée (titres infectieux, quantité de protéine et nombre de cellules infectées). Pour analyser de manière globale et pouvoir dégager des tendances, les résultats sont présentés sous la forme d'un tableau récapitulatif ci-dessous :

	H1	H2	H3	B1	B1-like	B3	C1	C1-like	C3
Titres 24h	+							+	
Western blot 24h	+	--	--	--	--	--	--		--
Titres 48h				-	-	--	--	--	--
Western blot 48h	+	--		+	+	--		+	--
% de cellules infectées 48h	+	--	--			--			--

Tableau 3 : Synthèse des résultats de titrages, western blot et de FACS obtenus au cours de cette étude à 24 et 48h post-infection. NOIR: pas effet des IFITMs par rapport au contrôle, VERT «+» : effet positif des IFITMs par rapport au contrôle et ROSE «-» : effet restrictif mais modéré des IFITMs et ROUGE «--» : effet fortement restrictif des IFITMs.

De cette synthèse, on peut dégager deux observations principales:

- i) H1 ne présente absolument pas d'activité de restriction sur le RVFV mais au contraire promeut fortement l'infection de celui-ci tandis que C1 a une activité restrictive partielle (western blot à 24h et titres à 48h) et que B1, B1-Like et C1-Like parfois bloque et parfois promeuvent l'infection.
- ii) H2, H3 ont une activité antivirale qui cependant ne se traduit pas par une diminution du titre infectieux à 48h contrairement aux deux autres IFITM-3s : B3 et C3 qui présentent une forte activité de restriction à 24 et 48h.

III. Effet des IFITMs de diverses espèces sur le virus Toscana.

Afin de mieux comprendre le spectre d'action antivirale des IFITMs, nous avons souhaité tester l'activité de ceux-ci sur un virus très proche du RVFV appartenant au même genre: les phlébovirus. Pour cela nous avons choisi le virus Toscana (TOSV), un phébovirus pathogène mais non mortel pour l'humain donc moins virulent que le RVFV (Valassina, Cusi, et Valensin 2003) mais capable d'infecter d'autres animaux tels que les ovins ou les chiens. (Navarro-Marí *et al.* 2011; Dahmani *et al.* 2016) Pour cela, en 2019/2020, j'ai encadré un étudiant en Master 2, Adrien Thiesson, avec qui nous avons réalisé le même type d'expérience que pour le RVFV avec les IFITMs humains et bovins.

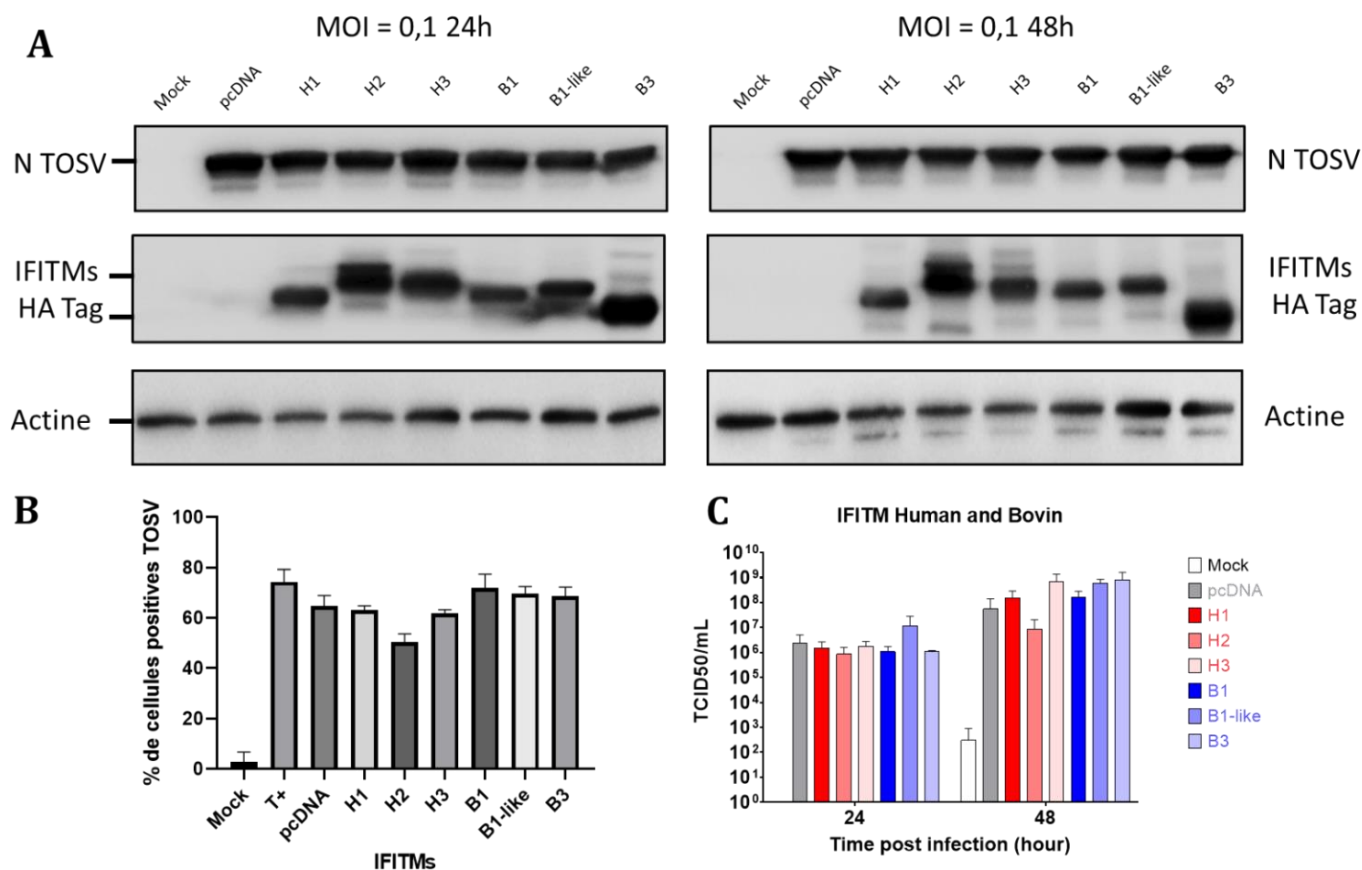


Figure 22 : Effets des IFITMs humains et bovins sur la réplication du virus Toscana. **A.** Analyses par western blot des protéines IFITM1/2/3 et de la nucléoprotéine N de TOSV à 24h et 48h post-infection de cellules 293T transfectées avec un plasmide vide (pcDNA) ou les plasmides exprimant les IFITMs humains (IFITM H1, H2 et H3) et les IFITMs bovins (IFITM B1, B1-like et B3) étiquetés en N terminal avec l'hémagglutinine (HA), et infectées par TOSV (MOI=0,1). Un contrôle négatif avec des cellules non transfectées et non infectées (Mock) a été réalisé. Des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du TOSV (N TOSV), l'étiquette HA (IFITM HA Tag) et l'actine ont été utilisés pour révéler les protéines d'intérêt. **B.** Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules infectées. Les barres représentent la moyenne obtenue avec 3 réplicats techniques ainsi que l'erreur standard pour chaque condition. Les différences entre chaque condition ont été testées à l'aide du test de Wilcoxon-Mann-Whitney (ns: p-value > 0.05, * : p-value < 0.05). **C.** Titres infectieux de TOSV exprimés en TCID50/ml mesurés à 24h (T+24h) et 48h (T+48h) pi (MOI=0,1) à partir de surnageants de culture de cellules 293T transfectées avec pcDNA ou les plasmides exprimant les IFITMs.

Comme présenté sur la figure 22, aucune restriction virale n'est observée sur le TOSV quel que soit l'IFITM exprimé. Ce non-effet est observé par western blot (**Figure 22A**), cytométrie en flux (**Figure 22B**) et par titrage viral (**Figure 22C**). Pour ce dernier, seule une légère diminution du titre infectieux est observée en présence de H2 qui pourrait donc avoir un effet. L'analyse par cytométrie de flux montre un pourcentage élevé de cellules positives infectées par TOSV (entre 60% et 90%). La multiplicité d'infection pour ces expériences TOSV étant beaucoup plus élevée que pour le RVFV (MOI=0,1 vs 0,001), il sera important de répéter ces expériences avec une MOI plus faible (i.e. comparable à celle utilisée pour le RVFV) pour

confirmer de manière générale la plus grande résistance du TOSV mais aussi potentiellement l'effet de H2 sur celui-ci.

DISCUSSION

Résistance et susceptibilité du RVFV aux IFITMs.

Dans la première partie de mon projet, j'ai pu montrer que la souche MP12 du RVFV était résistante à la restriction tardive induite par les IFITMs avec une absence de diminution de l'infectivité (Tartour *et al.* 2017). D'autre part, mes résultats indiquent également que la souche ZH548 est susceptible aux IFITM H2 et H3 sans pouvoir distinguer entre restriction précoce et tardive. Par ailleurs, il a été montré qu'une autre souche de RVFV (ZH501) ainsi que la MP12 était sensible à la restriction précoce induite par les IFITMs (Mudhasani *et al.* 2013). Il est donc possible que le RVFV et ces différentes souches soient sensibles à la restriction précoce et non tardive induite par les IFITMs. Cela sous entendrait aussi que les mécanismes mis en jeu au cours de la restriction précoce ou tardive par les IFITMs, et qui ne sont pas encore clairement élucidés, soient différents. Il sera donc intéressant de tester l'effet tardif des IFITMs sur les souches telles que la ZH501 ou ZH548 ou *a contrario* leur effet précoce sur la MP12.

Il est également envisageable que selon la souche RVFV étudiée des différences en termes de susceptibilité/résistance aux IFITMs existent (restriction précoce et/ou tardive). Cette variation souche-dépendante de la restriction des IFITMs a par ailleurs été montrée pour le VIH avec une plus forte résistance aux IFITMs selon les souches considérées avec pour déterminant le domaine V3 loop de la glycoprotéine de surface qui détermine l'usage du corécepteur CXCR4 or CCR5 lors de l'étape d'entrée (Y. Wang *et al.* 2017). Il est important de noter que la souche atténuée MP12 dérive d'une mutagenèse à 5-fluorouracilide avec des passages en série de la ZH548 (Caplen, Peters, et Bishop 1985) dans des cellules humaines de poumon MRC-5. Ces cellules expriment constitutivement les trois IFITMs humains (Xie *et al.* 2015) et il est donc possible qu'au cours des passages successives une pression de sélection se soit exercée sur la MP12 qui a pu acquérir des mutations la rendant résistante à ces facteurs de restriction contrairement à la ZH548.

La MP12 dérivant de la ZH548, elles sont extrêmement proches génétiquement. Il n'y a par exemple que trois acides aminés différents entre Gn-Gc de MP12 et ZH548 (1 dans Gn et 2 dans Gc ; Gn étant celui qui très probablement celle qui interagit avec le/les récepteurs cellulaires). Chacune de ces trois mutations est capable d'atténuer le virus suggérant l'effet important de ces mutations sur la biologie du virus et probablement l'entrée virale (Ikegami *et al.* 2015). De plus, en parallèle de mon travail avec la souche MP12, une chercheuse de l'équipe, Saw-See Hong, a testé la capacité de restriction tardive des IFITMs avec des pseudo-particules virales de type Vesicular Stomatitis Virus (VSV) portant à leur surface les protéines Gn-Gc de la souche ZH548. Elle a pu montrer un effet restrictif des trois IFITMs humains qui diminuent l'infectivité de ces VSV. **(Figure 23)** Ce résultat suggère donc que la glycoprotéine Gn-Gc de la ZH548 n'induit pas de résistance à la restriction tardive des IFITMs et il serait intéressant de tester des VSV avec les Gn-Gc de la MP12 pour vérifier une éventuelle implication des glycoprotéines virales dans une résistance/susceptibilité souche dépendante du RVFV.

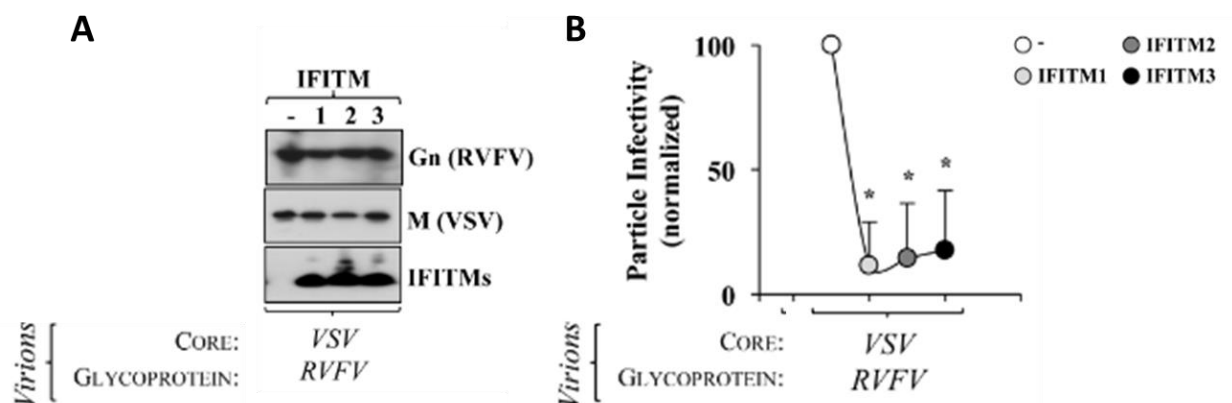


Figure 23 : Analyse de l'expression des différentes protéines virales et cellulaires par Western Blot et effet des IFITMs sur VSV-RVFV. A. Les culots viraux issus des surnageants ont été marqués par les anticorps suivants Gn-RVFV (56 kDa), M-VSV (27 kDa) et Anti-Flag pour détecter l'expression des IFITMs (17kDa). **B.** Après normalisation, l'infectivité des particules virales VSV-RVFV a été testée en présence des IFITMs ou du témoin pcDNA.

Effet des IFITMs sur les phénuivirus et les phlébovirus.

La résistance du RVFV-MP12 à la restriction tardive induite aux différents IFITMs humains apparaît comme spécifique dans le sens où un autre virus de la famille des *phenuiviridae* mais du genre *Nairovirus* (Dugbe virus : DUGV) est sensible à la restriction induite par IFITM H1 et pas à celle des IFITM H2 et 3. (Tartour *et al.* 2017) **(ANNEXE 1)** Ces résultats corrélerent avec une autre étude montrant une résistance de la MP12 et une susceptibilité de DUGV à IFITM H1.

De plus et de façon très surprenante, les expériences que nous avons menées montrent une grande différence entre le RVFV et TOSV qui appartiennent au même genre des phlébovirus. En effet, tandis que RVFV-ZH548 présente une susceptibilité aux IFITMs (2 et 3), le TOSV semble extrêmement voire totalement résistance aux IFITMs humains (peut-être un léger effet d'IFITM H2) et ceux des autres espèces testées. Globalement, il apparait donc que la résistance ou non des virus soit très spécifique car elle dépend à la fois de l'IFITM (1, 2 ou 3), de l'étape de restriction (précoce ou tardive) et du virus voire même de la souche virale considérée. Ce point suggère que des déterminants viraux existent chez certains virus/souches virales pour échapper à la restriction des IFITMs comme cela a pu être montré pour le domaine V3-Loop de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH. (Y. Wang *et al.* 2017) De plus, le fait que le TOSV soit extrêmement résistant alors que le RVFV est plus susceptible aux IFITMs semble contre-intuitif dans la mesure où le RVFV est significativement plus virulent que le TOSV (1-2% de mortalité *versus* non létal pour l'homme). Néanmoins, il est important de replacer ces données obtenues avec les IFITMs dans le contexte plus large de l'immunité innée et des contremesures virales. En effet, même s'il a été montré qu'*in vitro* les IFITMs comptent pour 50% de la restriction virale induite par traitement à l'IFN-I (Mudhasani *et al.* 2013), les IFITMs ne représentent qu'un facteur de restriction parmi tant d'autres et bien évidemment leur effet ne peut expliquer à lui seul les variations de pathogénicité et/ou l'issue fatal ou non des infections par RVFV ou TOSV. De plus, ces virus ont développé des contre-mesures différentes pour échapper ou bloquer les voies de défense induites au cours de l'immunité innée. Une des particularités importantes du RVFV provient de la protéine NSs qui est capable de bloquer la transcription globale de la cellule (Le May *et al.* 2004) contrairement au TOSV pour lequel ce mécanisme n'est pas décrit. Contrairement au TOSV, le RVFV à travers la NSs est capable de réduire significativement l'expression des ISGs et donc des IFITMs dans les cellules infectées et il n'a donc peut-être pas une extrême nécessité à développer une contre-mesure ou une résistance forte et spécifique contre les IFITMs. Le TOSV est capable de diminuer l'induction de la voie de synthèse de l'IFN-I *via* sa NSs (Michèle Bouloy *et al.* 2001; Gori-Savellini, Valentini, et Cusi 2013) mais cela est peut-être partiel (et en tout cas pas suffisant) et une résistance aux IFITMs peut représenter un certain avantage.

Pour le TOSV nous observons un léger effet d'IFITM H2 qui est l'IFITM humain induisant le plus de résistance au RVFV. Les données obtenues avec TOSV sont encore préliminaires mais il est possible que le TOSV (*per se* ou selon nos conditions expérimentales) surpasse et échappe en grande partie la restriction induite par les IFITMs. Il sera important de confirmer les résultats

en particulier en abaissant la multiplicité d'infection (de 0,1 à 0,001) pour la rendre comparable au RVFV. De plus, la souche de TOSV utilisée pour ces expériences appartient au lignage génétique B qui est significativement plus replicative qu'une autre disponible au laboratoire de lignage A. Il sera donc intéressant de réaliser des expériences avec ces deux souches pour déterminer si des variations souches dépendantes de résistance ou susceptibilité aux IFITMs existent.

D'autre part, on ne peut pas exclure que la résistance du TOSV envers les IFITMs et/ou celle du RVFV-MP12 pour la restriction tardive des IFITMs humains puisse être due à l'existence d'antagonistes viraux. Au début de mon projet, nous disposions uniquement d'un système de génétique inverse pour le RVFV et aucun n'était disponible pour le TOSV nous empêchant donc de modifier son génome et de produire des virus mutants afin d'étudier le rôle et la fonction de ces protéines virales. Notre équipe en collaboration avec Alain Kohl à Glasgow a donc développé un système de génétique inverse pour TOSV, un projet auquel j'ai participé et qui a donné lieu à une publication dans laquelle je suis 2^{ème} auteur (Alexander *et al.* 2020) (**ANNEXE 2**). Aujourd'hui, grâce aux systèmes de génétique inverse disponibles pour TOSV et RVFV nous pourrions essayer d'identifier le ou les protéines virales potentiellement capables d'antagoniser les IFITMs.

Restriction virale des IFITMs sur le RVFV chez différentes espèces.

Dans la deuxième partie de mon projet, je me suis intéressée à la restriction des IFITMs issus de différentes espèces, l'homme mais aussi les bovins et les camélidés qui sont infectés naturellement par le RVFV. L'objectif étant de déterminer la capacité globale de restriction de ces IFITMs sur le RVFV, les plasmides exprimant les différents IFITMs ont d'abord été transfectés dans les cellules qui ont été infectées 24h après. Suivant cette méthodologie, le virus est donc à la fois à la restriction précoce et celle tardive sans qu'il soit possible de les différencier. Globalement, les résultats indiquent une susceptibilité du RVFV-ZH548 aux IFITM-2 et -3 humains et plus fortement aux IFITM-3 bovin et de camélidé. Le fait que les IFITM-2 et -3 soient plus restrictifs que les IFITMs humains pourraient suggérer une différence en termes de restriction précoce et tardive. En effet, il est possible que les IFITMs humains ne puissent pas diminuer l'infectivité des particules virales néoformées tandis que l'IFITM-3 bovin et de camélidé en soient capables. Il sera donc intéressant *a minima* pour les IFITM-3 humain, bovin et de camélidé de tester et comparer leur capacité de restriction précoce et tardive. Si tel était

le cas cela permettrait aussi éventuellement d'identifier les séquences nécessaires à la restriction tardive des IFITM-3s.

Les IFITM-1 n'ont pas d'activité de restriction sur le RVFV et pour certains sont même capable de promouvoir la réplication virale. Contrairement aux IFITM-1 qui sont majoritairement localisés à la membrane plasmique, les IFITM-2 et 3 possèdent en N-Terminal le domaine YEML qui leur permet de cette localiser dans les compartiments intracellulaires endosomiques. Comme montré précédemment avec le virus influenza (Jia *et al.* 2012), la localisation endosomique et le domaine YEML pourraient donc être clé dans la capacité de restriction des IFITMs ; l'entrée virale du RVFV se faisant par endocytose car la fusion membranaire et l'infection sont induites par un pH bas (Filone *et al.* 2006; 2010). D'autre part, aux étapes tardives, l'assemblage des nouveaux virions se passe dans l'appareil de Golgi et non à la membrane plasmique. Globalement, la localisation cellulaire des IFITM-2 et -3 corrèle avec les étapes clés du cycle viral du RVFV. Une mutagénèse du motif YEML permettrait de préciser son rôle dans la restriction des IFITMs sur le RVFV.

Concernant les IFITM-1s, mes résultats indiquent de manière générale une activité restrictive plus faible que les IFITM-2 et -3 mais aussi plus variable avec parfois une restriction ou une stimulation de l'infection. A ce jour, une seule étude a montré la capacité des IFITMs à promouvoir l'infection. Le coronavirus HCoV-OC43 pour lequel les IFITM H2 et H3 mais aussi les IFITM1 et 3 de souris stimule l'infection (X. Zhao *et al.* 2014). La partie C-Terminale de ces IFITMs semble essentielle pour observer l'effet positif sur l'infection du HCoV-OC43 et dans le cas des IFITM-1s que nous avons testés la partie C-Terminale est celle qui présente aussi le plus de variabilité en termes de séquence d'acides aminés ce qui pourrait expliquer la diversité des effets observées de ces IFITMs-1 sur le RVFV. De manière intéressante et même si ces résultats doivent être confirmés, les deux IFITM-1 et 1-Like de camélidé semblent présenter une activité de restriction au RVFV plus forte que les IFITM-1 des autres espèces avec une réduction des titres viraux à 48h post-infection. Néanmoins et de façon surprenante, à 48h post-infection, aucune différence n'est observée avec ces deux IFITM-1 en termes de quantité de protéine N-RVFV ou de nombre de cellules infectées, ceci étant peut-être indicatif d'un mécanisme différent par rapport aux autres espèces. D'autre part et de manière reproductible, les trois IFITMs de camélidé contrairement aux IFITMs bovins et humains réduisent significativement les effets cytopathiques (CPE) du RVFV observés sur les cellules infectées. Il est donc intéressant de noter que globalement les IFITMs de camélidé sont plus restrictifs pour le RVFV que ceux des autres

espèces avec notamment une diminution des CPE viro-induits sachant que les dromadaires sont des réservoirs du RVFV pouvant être infectés et très souvent asymptomatiques.

La restriction des IFITMs sur les phlébovirus dans le contexte global de l'immunité innée et des autres ISGs.

La biologie des phlébovirus chez les mammifères soulèvent une question fondamentale qui reste sans réponse, à savoir pourquoi selon les virus et/ou les espèces considérées les infections sont asymptomatiques ou à l'extrême mortelles. Après infection, la cellule détecte les virus et induit rapidement les réponses immunitaires innées activant entre autre la voie de signalisation des interférons de type I (IFN-I) qui conduit à l'expression des gènes stimulés par l'interféron (ISGs) dont font partie les IFITMs et qui visent à empêcher la réplication virale. En tant que telles, ces réponses immunitaires innées modulent probablement la réplication des phlébovirus (et donc potentiellement la pathogénicité), étant donné que ces virus ont développé des stratégies diverses et distinctes pour détourner ou contrecarrer ces réponses immunitaires qui elles-mêmes peuvent être différentes selon l'espèce hôte. Même si *in vitro* les IFITMs représentent une part importante de l'activité antivirale sur le RVFV suite à un traitement à l'IFN-I et que, comme j'ai pu l'observer, des différences existent entre les espèces (Mudhasani *et al.* 2013), les IFITMs ne représentent qu'une petite partie des facteurs de restriction pouvant être exprimés suite à une infection virale. Par conséquent, plusieurs questions importantes au-delà des IFITMs restent encore sans réponse telles que:

- ▀ Quels sont les ISGs exprimés au cours de l'infection par les phlébovirus et en quelle quantité?
- ▀ Quels ISGs sont capables de bloquer ou non la réplication des phlébovirus?
- ▀ Si une résistance virale est observée, quel(s) est/sont le(s) antagoniste(s) mis en jeu?

Pour répondre à ces questions et comprendre la complexité de ces interactions hôte-phlébovirus, nous pourrions mettre en œuvre une approche globale et comparative entre le RVFV et le TOSV chez les humains et bovins. Une approche de séquençage à haut débit ARNseq de cellules humaines et bovines infectées ou non par ces virus permettra de mesurer le niveau global et individuel d'IFN-I et d'expression des ISGs au cours de l'infection. La capacité de chaque ISG humain et bovin à bloquer le cycle de réplication de ces virus pourra être testée en criblant des banques d'ISGs disponibles pour ces deux espèces chez notre collaborateur au Center for Virus Research à Glasgow (Royaume-Uni). Les données générées par ces approches

permettront : i) de confirmer et compléter les données obtenues sur les IFITMs et ii) mettront en évidence les principales interactions virus-hôte spécifiques qui devront être étudiées de manière plus approfondie pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués.

Les données de mon projet sur les IFITMs et celles qui pourraient être générées à travers ces approches plus globales permettront donc de mieux comprendre les interactions entre les phlébovirus et l'immunité innée chez les mammifères et certainement d'apporter des informations sur la pathogénèse induite par ces virus qui peut varier en termes de signes cliniques et de mortalité selon les espèces infectées.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, Ahmed, Mubarak Mustafa Elkarsany, et Ishag Adam. 2009. « Manifestations of severe Rift Valley fever in Sudan ». *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 14 (juillet): e179-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.029>.
- Albertini, Aurélie, Eduard Baquero, Anna Ferlin, et Yves Gaudin. 2012. « Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry ». *Viruses* 4 (décembre): 117-39. <https://doi.org/10.3390/v4010117>.
- Alexander, Akira J. T., Marie-Pierre Confort, Sophie Desloire, James I. Dunlop, Srikeerthana Kuchi, Vattipally B. Sreenu, Daniel Mair, *et al.* 2020a. « Development of a Reverse Genetics System for Toscana Virus (Lineage A) ». *Viruses* 12 (4). <https://doi.org/10.3390/v12040411>.
- Amini-Bavil-Olyaei, Samad, Youn Jung Choi, Jun Han Lee, Mude Shi, I.-Chueh Huang, Michael Farzan, et Jae U. Jung. 2013. « The Antiviral Effector IFITM3 Disrupts Intracellular Cholesterol Homeostasis to Block Viral Entry ». *Cell Host & Microbe* 13 (4): 452-64. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.006>.
- Anafu, Amanda A., Christopher H. Bowen, Christopher R. Chin, Abraham L. Brass, et Geoffrey H. Holm. 2013. « Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (24): 17261-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438515>.
- Arikawa, J., I. Takashima, et N. Hashimoto. 1985. « Cell Fusion by Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome (HFRS) Viruses and Its Application for Titration of Virus Infectivity and Neutralizing Antibody ». *Archives of Virology* 86 (3): 303-13. <https://doi.org/10.1007/BF01309834>.
- Bailey, Charles C., I.-Chueh Huang, Christina Kam, et Michael Farzan. 2012. « Ifitm3 Limits the Severity of Acute Influenza in Mice ». *PLoS Pathogens* 8 (9): e1002909. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002909>.
- Bailey, Charles C., Guocai Zhong, I-Chueh Huang, et Michael Farzan. 2014a. « IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense ». *Annual review of virology* 1 (novembre): 261-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085537>.
- Benfield, Camilla T. O., Sarah E. Smith, Edward Wright, Rachael S. Wash, Francesca Ferrara, Nigel J. Temperton, et Paul Kellam. 2015. « Bat and Pig IFN-Induced Transmembrane Protein 3 Restrict Cell Entry by Influenza Virus and Lyssaviruses ». *The Journal of General Virology* 96 (Pt 5): 991-1005. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000058>.
- Bertrand, Pascale, Marceline Côté, Yi-Min Zheng, Lorraine M. Albritton, et Shan-Lu Liu. 2008. « Jaagsiekte Sheep Retrovirus Utilizes a pH-Dependent Endocytosis Pathway for Entry ». *Journal of Virology* 82 (5): 2555-59. <https://doi.org/10.1128/JVI.01853-07>.

- Besselaar, T. G., et N. K. Blackburn. 1991. « Topological Mapping of Antigenic Sites on the Rift Valley Fever Virus Envelope Glycoproteins Using Monoclonal Antibodies ». *Archives of Virology* 121 (1-4): 111-24. <https://doi.org/10.1007/BF01316748>.
- Bett, B., P. Kiunga, J. Gachohi, C. Sindato, D. Mbotha, T. Robinson, J. Lindahl, et D. Grace. 2017. « Effects of Climate Change on the Occurrence and Distribution of Livestock Diseases ». *Preventive Veterinary Medicine* 137 (Pt B): 119-29. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.019>.
- Billet, A., Alex A. Compton, et O. Schwartz. 2015. « La famille des protéines IFITM : effets antiviraux et fonctions cellulaires ». <https://doi.org/10.1684/vir.2015.0625>.
- Bird, Brian H., Thomas G. Ksiazek, Stuart T. Nichol, et N. James Maclachlan. 2009. « Rift Valley Fever Virus ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234 (7): 883-93. <https://doi.org/10.2460/javma.234.7.883>.
- Blyth, Graham A. D., Wing Fuk Chan, Robert G. Webster, et Katharine E. Magor. 2016. « Duck Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Mediates Restriction of Influenza Viruses ». *Journal of Virology* 90 (1): 103-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01593-15>.
- Boer, S. M. de, J. Kortekaas, L. Spel, P. J. M. Rottier, R. J. M. Moormann, et B. J. Bosch. 2012. « Acid-Activated Structural Reorganization of the Rift Valley Fever Virus Gc Fusion Protein ». *Journal of Virology* 86 (24): 13642-52. <https://doi.org/10.1128/JVI.01973-12>.
- Bouloy, Michèle, Christian Janzen, Pierre Vialat, Huot Khun, Jovan Pavlovic, Michel Huerre, et Otto Haller. 2001. « Genetic Evidence for an Interferon-Antagonistic Function of Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs ». *Journal of Virology* 75 (3): 1371-77. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.3.1371-1377.2001>.
- Bouloy, Michele, et Friedemann Weber. 2010. « Molecular Biology of Rift Valley Fever Virus ». *The Open Virology Journal* 4 (avril): 8-14. <https://doi.org/10.2174/1874357901004010008>.
- Brass, Abraham L., I-Chueh Huang, Yair Benita, Sinu P. John, Manoj N. Krishnan, Eric M. Feeley, Bethany J. Ryan, et al. 2009b. « The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus ». *Cell* 139 (7): 1243-54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.12.017>.
- Brustolin, M., S. Talavera, A. Nuñez, C. Santamaría, R. Rivas, N. Pujol, M. Valle, et al. 2017. « Rift Valley Fever Virus and European Mosquitoes: Vector Competence of Culex Pipiens and Stegomyia Albopicta (= Aedes Albopictus) ». *Medical and Veterinary Entomology* 31 (4): 365-72. <https://doi.org/10.1111/mve.12254>.
- Calisher, Charles H., James E. Childs, Hume E. Field, Kathryn V. Holmes, et Tony Schountz. 2006. « Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses ». *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3): 531. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.
- Caplen, H., C. J. Peters, et D. H. Bishop. 1985. « Mutagen-Directed Attenuation of Rift Valley Fever Virus as a Method for Vaccine Development ». *The Journal of General Virology* 66 (Pt 10) (octobre): 2271-77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2271>.
- Carette, Jan E., Matthijs Raaben, Anthony C. Wong, Andrew S. Herbert, Gregor Obernosterer, Nirupama Mulherkar, Ana I. Kuehne, et al. 2011. « Ebola Virus Entry Requires the

- Cholesterol Transporter Niemann-Pick C1 ». *Nature* 477 (7364): 340-43. <https://doi.org/10.1038/nature10348>.
- Chan, Ying Kai, I-Chueh Huang, et Michael Farzan. 2012. « IFITM Proteins Restrict Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection ». *PLoS ONE* 7 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034508>.
- Chen, W. J., J. L. Goldstein, et M. S. Brown. 1990. « NPXY, a Sequence Often Found in Cytoplasmic Tails, Is Required for Coated Pit-Mediated Internalization of the Low Density Lipoprotein Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (6): 3116-23.
- Chen, Y. C., S. Y. Wang, et C. C. King. 1999. « Bacterial Lipopolysaccharide Inhibits Dengue Virus Infection of Primary Human Monocytes/Macrophages by Blockade of Virus Entry via a CD14-Dependent Mechanism ». *Journal of Virology* 73 (4): 2650-57. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.4.2650-2657.1999>.
- Chutiwitoonchai, Nopporn, Masateru Hiyoshi, Yuka Hiyoshi-Yoshidomi, Michihiro Hashimoto, Kenzo Tokunaga, et Shinya Suzu. 2013. « Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins ». *Microbes and Infection* 15 (4): 280-90. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.12.003>.
- Côté, Marceline, John Misasi, Tao Ren, Anna Bruchez, Kyungae Lee, Claire Marie Filone, Lisa Hensley, et al. 2011. « Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for ebolavirus infection ». *Nature* 477 (7364): 344-48. <https://doi.org/10.1038/nature10380>.
- Côté, Marceline, Yi-Min Zheng, et Shan-Lu Liu. 2009. « Receptor Binding and Low pH Coactivate Oncogenic Retrovirus Envelope-Mediated Fusion ». *Journal of Virology* 83 (22): 11447-55. <https://doi.org/10.1128/JVI.00748-09>.
- Dahmani, Mustapha, Sulaf Alwassouf, Sébastien Grech-Angelini, Jean-Lou Marié, Bernard Davoust, et Rémi N. Charrel. 2016. « Seroprevalence of Toscana virus in dogs from Corsica, France ». *Parasites & Vectors* 9 (juillet). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1665-4>.
- Danthi, Pranav, Geoffrey H. Holm, Thilo Stehle, et Terence S. Dermody. 2013. « REOVIRUS RECEPTORS, CELL ENTRY, AND PROAPOPTOTIC SIGNALING ». *Advances in experimental medicine and biology* 790: 42-71. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_3.
- Daubney, R., J. R. Hudson, et P. C. Garnham. 1931. « Enzootic Hepatitis or Rift Valley Fever. An Undescribed Virus Disease of Sheep Cattle and Man from East Africa ». *The Journal of Pathology and Bacteriology* 34 (4): 545-79. <https://doi.org/10.1002/path.1700340418>.
- Der, Sandy D., Aimin Zhou, Bryan R. G. Williams, et Robert H. Silverman. 1998. « Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15623-28.
- Diamond, Michael, et Michael Farzan. 2012. « The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins ». *Nature reviews. Immunology* 13 (décembre). <https://doi.org/10.1038/nri3344>.

- Drosten, Christian, Stephan Göttig, Stefan Schilling, Marcel Asper, Marcus Panning, Herbert Schmitz, et Stephan Günther. 2002. « Rapid Detection and Quantification of RNA of Ebola and Marburg Viruses, Lassa Virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus, Rift Valley Fever Virus, Dengue Virus, and Yellow Fever Virus by Real-Time Reverse Transcription-PCR ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2323-30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>.
- Eddy, GA, CJ Peters, G Meadors, et FE Cole Jr. 1981. « Rift Valley fever vaccine for humans ». *Contributions to epidemiology and biostatistics: Rift Valley fever*, 1981.
- Elliott, Richard M. 1997. « Emerging Viruses: The Bunyaviridae ». *Molecular Medicine* 3 (9): 572-77. <https://doi.org/10.1007/BF03401814>.
- Ellis, D. S., D. I. Simpson, S. Stamford, et K. S. Abdel Wahab. 1979. « Rift Valley Fever Virus: Some Ultrastructural Observations on Material from the Outbreak in Egypt 1977 ». *The Journal of General Virology* 42 (2): 329-37. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-42-2-329>.
- Everitt, Aaron R., Simon Clare, Thomas Pertel, Sinu P. John, Rachael S. Wash, Sarah E. Smith, Christopher R. Chin, et al. 2012. « IFITM3 Restricts the Morbidity and Mortality Associated with Influenza ». *Nature* 484 (7395): 519-23. <https://doi.org/10.1038/nature10921>.
- Favier, Charly, Karine Chalvet-Monfray, Philippe Sabatier, Renaud Lancelot, Didier Fontenille, et Marc A. Dubois. 2006. « Rift Valley Fever in West Africa: The Role of Space in Endemicity ». *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 11 (12): 1878-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01746.x>.
- Feeley, Eric M., Jennifer S. Sims, Sinu P. John, Christopher R. Chin, Thomas Pertel, Li-Mei Chen, Gaurav D. Gaiha, et al. 2011. « IFITM3 Inhibits Influenza A Virus Infection by Preventing Cytosolic Entry ». *PLOS Pathogens* 7 (10): e1002337. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002337>.
- Feng, Junjie, Arthur Wickenhagen, Matthew L. Turnbull, Veronica V. Rezelj, Felix Kreher, Natasha L. Tilston-Lunel, Gillian S. Slack, et al. 2018. « Interferon-Stimulated Gene (ISG)-Expression Screening Reveals the Specific Antibunyaviral Activity of ISG20 ». *Journal of Virology* 92 (13). <https://doi.org/10.1128/JVI.02140-17>.
- Filone, Claire Marie, Sheri L. Hanna, M. Cecilia Caino, Shelly Bambina, Robert W. Doms, et Sara Cherry. 2010. « Rift Valley Fever Virus Infection of Human Cells and Insect Hosts Is Promoted by Protein Kinase C Epsilon ». *PLOS ONE* 5 (11): e15483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015483>.
- Filone, Claire Marie, Mark Heise, Robert W. Doms, et Andrea Bertolotti-Ciarlet. 2006. « Development and Characterization of a Rift Valley Fever Virus Cell-Cell Fusion Assay Using Alphavirus Replicon Vectors ». *Virology* 356 (1): 155-64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.035>.
- Finkelshtein, Danit, Ariel Werman, Daniela Novick, Sara Barak, et Menachem Rubinstein. 2013. « LDL Receptor and Its Family Members Serve as the Cellular Receptors for Vesicular Stomatitis Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (18): 7306-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>.

- Flick, Ramon, et Michèle Bouloy. 2005. « Rift Valley Fever Virus ». *Current Molecular Medicine* 5 (8): 827-34. <https://doi.org/10.2174/156652405774962263>.
- Foster, Toshana L., Harry Wilson, Shilpa S. Iyer, Karen Coss, Katie Doores, Sarah Smith, Paul Kellam, *et al.* 2016. « Resistance of Transmitted Founder HIV-1 to IFITM-Mediated Restriction ». *Cell Host & Microbe* 20 (4): 429-42. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.08.006>.
- García-Sastre, Adolfo. 2017. « Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses ». *Cell Host & Microbe* 22 (2): 176-84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>.
- Gori-Savellini, Gianni, Melissa Valentini, et Maria Grazia Cusi. 2013. « Toscana Virus NSs Protein Inhibits the Induction of Type I Interferon by Interacting with RIG-I ». *Journal of Virology* 87 (12): 6660-67. <https://doi.org/10.1128/JVI.03129-12>.
- Habjan, Matthias, Andreas Pichlmair, Richard M. Elliott, Anna K. Overby, Timo Glatter, Matthias Gstaiger, Giulio Superti-Furga, Hermann Unger, et Friedemann Weber. 2009. « NSs Protein of Rift Valley Fever Virus Induces the Specific Degradation of the Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase ». *Journal of Virology* 83 (9): 4365-75. <https://doi.org/10.1128/JVI.02148-08>.
- Hanagata, Nobutaka. 2016. « IFITM5 Mutations and Osteogenesis Imperfecta ». *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 34 (2): 123-31. <https://doi.org/10.1007/s00774-015-0667-1>.
- Harmon, Brooke, Benjamin R. Schudel, Dianna Maar, Carol Kozina, Tetsuro Ikegami, Chien-Te Kent Tseng, et Oscar A. Negrete. 2012. « Rift Valley Fever Virus Strain MP-12 Enters Mammalian Host Cells via Caveola-Mediated Endocytosis ». *Journal of Virology* 86 (23): 12954-70. <https://doi.org/10.1128/JVI.02242-12>.
- Hickford, Danielle, Stephen Frankenberg, Geoff Shaw, et Marilyn B. Renfree. 2012. « Evolution of Vertebrate Interferon Inducible Transmembrane Proteins ». *BMC Genomics* 13 (avril): 155. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-155>.
- Hollidge, Bradley S., Natalia B. Nedelsky, Mary-Virginia Salzano, Jonathan W. Fraser, Francisco González-Scarano, et Samantha S. Soldan. 2012. « Orthobunyavirus Entry into Neurons and Other Mammalian Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Requires Trafficking into Early Endosomes ». *Journal of Virology* 86 (15): 7988-8001. <https://doi.org/10.1128/JVI.00140-12>.
- Hoogstraal, H., J. M. Meegan, G. M. Khalil, et F. K. Adham. 1979. « The Rift Valley Fever Epizootic in Egypt 1977-78. 2. Ecological and Entomological Studies ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73 (6): 624-29. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90005-1).
- Huang, I.-Chueh, Charles C. Bailey, Jessica L. Weyer, Sheli R. Radoshitzky, Michelle M. Becker, Jessica J. Chiang, Abraham L. Brass, *et al.* 2011. « Distinct Patterns of IFITM-Mediated Restriction of Filoviruses, SARS Coronavirus, and Influenza A Virus ». *PLOS Pathogens* 7 (1): e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001258>.
- Hunt, Catherine L., Nicholas J. Lennemann, et Wendy Maury. 2012. « Filovirus Entry: A Novelty in the Viral Fusion World ». *Viruses* 4 (2): 258-75. <https://doi.org/10.3390/v4020258>.

- Ikegami, Tetsuro, Terence E. Hill, Jennifer K. Smith, Lihong Zhang, Terry L. Juelich, Bin Gong, Olga A. L. Slack, Hoai J. Ly, Nandadeva Lokugamage, et Alexander N. Freiberg. 2015. « Rift Valley Fever Virus MP-12 Vaccine Is Fully Attenuated by a Combination of Partial Attenuations in the S, M, and L Segments ». *Journal of Virology* 89 (14): 7262-76. <https://doi.org/10.1128/JVI.00135-15>.
- Ikegami, Tetsuro, et Shinji Makino. 2009. « Rift Valley fever vaccines ». *Vaccine* 27 Suppl 4 (novembre): D69-72. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.046>.
- Ikegami, Tetsuro, Krishna Narayanan, Sungyong Won, Wataru Kamitani, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2009. « Rift Valley Fever Virus NSs Protein Promotes Post-Transcriptional Downregulation of Protein Kinase PKR and Inhibits EIF2alpha Phosphorylation ». *PLoS Pathogens* 5 (2): e1000287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000287>.
- Inoue, Yuuki, Nobuyuki Tanaka, Yoshinori Tanaka, Shingo Inoue, Kouichi Morita, Min Zhuang, Toshio Hattori, et Kazuo Sugamura. 2007. « Clathrin-Dependent Entry of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus into Target Cells Expressing ACE2 with the Cytoplasmic Tail Deleted ». *Journal of Virology* 81 (16): 8722-29. <https://doi.org/10.1128/JVI.00253-07>.
- Jia, Rui, Qinghua Pan, Shilei Ding, Liwei Rong, Shan-Lu Liu, Yunqi Geng, Wentao Qiao, et Chen Liang. 2012. « The N-Terminal Region of IFITM3 Modulates Its Antiviral Activity by Regulating IFITM3 Cellular Localization ». *Journal of Virology* 86 (24): 13697-707. <https://doi.org/10.1128/JVI.01828-12>.
- Jia, Rui, Fengwen Xu, Jin Qian, Yunfang Yao, Chunhui Miao, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, et al. 2014a. « Identification of an endocytic signal essential for the antiviral action of IFITM3 ». *Cellular Microbiology* 16 (7): 1080-93. <https://doi.org/10.1111/cmi.12262>.
- Jiang, Dong, Jessica M. Weidner, Min Qing, Xiao-Ben Pan, Haitao Guo, Chunxiao Xu, Xianchao Zhang, et al. 2010. « Identification of Five Interferon-Induced Cellular Proteins That Inhibit West Nile Virus and Dengue Virus Infections ». *Journal of Virology* 84 (16): 8332-41. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-09>.
- Jin, Mirim, Junghyun Park, Sungwook Lee, Boyoun Park, Jinwook Shin, Ki-Joon Song, Tae-In Ahn, Sue-Yun Hwang, Byung-Yoon Ahn, et Kwangseog Ahn. 2002. « Hantaan Virus Enters Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis ». *Virology* 294 (1): 60-69. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1303>.
- Kading, Rebekah C., Mary B. Crabtree, Brian H. Bird, Stuart T. Nichol, Bobbie Rae Erickson, Kalanthe Horiuchi, Brad J. Biggerstaff, et Barry R. Miller. 2014. « 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 Neglected Tropical Diseases* 8 (2): e2670. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002670>.
- Kalvakolanu, D. V., et E. C. Borden. 1996. « An Overview of the Interferon System: Signal Transduction and Mechanisms of Action ». *Cancer Investigation* 14 (1): 25-53. <https://doi.org/10.3109/07357909609018435>.
- Kreher, Felix, Carole Tamietti, Céline Gomet, Laurent Guillemot, Myriam Ermonval, Anna-Bella Failloux, Jean-Jacques Panthier, Michèle Bouloy, et Marie Flamand. 2014. « The Rift Valley Fever Accessory Proteins NSm and P78/NSm-GN Are Distinct Determinants of Virus

- Propagation in Vertebrate and Invertebrate Hosts. » *Emerging Microbes & Infections* 3 (10): e71. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.71>.
- Lanz, Caroline, Emilio Yángüez, Dario Andenmatten, et Silke Stertz. 2015. « Correction for Lanz *et al.*, Swine Interferon-Inducible Transmembrane Proteins Potently Inhibit Influenza A Virus Replication ». *Journal of Virology* 89 (5): 2988. <https://doi.org/10.1128/JVI.03533-14>.
- Lapaquette, Pierre, Hang Thi Thu Nguyen, et Mathias Faure. 2017. « L'autophagie garante de l'immunité et de l'inflammation - « Tout est bien, tout va bien, tout va pour le mieux qu'il soit possible » ». *médecine/sciences* 33 (3): 305-11. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173303018>.
- Le May, Nicolas, Sandy Dubaele, Luca Proietti De Santis, Agnès Billecocq, Michèle Bouloy, et Jean-Marc Egly. 2004. « TFIIF Transcription Factor, a Target for the Rift Valley Hemorrhagic Fever Virus ». *Cell* 116 (4): 541-50. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00132-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00132-1).
- Lefevre, P. C. (Institut d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 1989. « Rift valley fever [in Egypt, Mauritania, Senegal] ». *Annales de Médecine Vétérinaire (Belgium)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE9000126>.
- Leung, Daisy W., Christopher F. Basler, et Gaya K. Amarasinghe. 2012a. « Molecular Mechanisms of Viral Inhibitors of RIG-I-like Receptors ». *Trends in Microbiology* 20 (3): 139-46. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.12.005>.
- Li, Kun, Ruben M. Markosyan, Yi-Min Zheng, Ottavia Golfetto, Brittani Bungart, Minghua Li, Shilei Ding, *et al.* 2013. « IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion ». *PLOS Pathogens* 9 (1): e1003124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003124>.
- Lihoradova, Olga, et Tetsuro Ikegami. 2014. « Countermeasure Development for Rift Valley Fever: Deletion, Modification or Targeting of Major Virulence Factor NSs ». *Future Virology* 9 (1): 27-39. <https://doi.org/10.2217/fvl.13.117>.
- Lin, Tsai-Yu, Christopher R. Chin, Aaron R. Everitt, Simon Clare, Jill M. Perreira, George Savidis, Aaron M. Aker, *et al.* 2013. « Amphotericin B Increases Influenza A Virus Infection by Preventing IFITM3-Mediated Restriction ». *Cell Reports* 5 (4): 895-908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.033>.
- Lindenbach, Brett. 2009. « Measuring HCV Infectivity Produced in Cell Culture and In Vivo ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 510 (février): 329-36. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-394-3_24.
- Lu, Jennifer, Qinghua Pan, Liwei Rong, Wei He, Shan-Lu Liu, et Chen Liang. 2011. « The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection ». *Journal of Virology* 85 (5): 2126-37. <https://doi.org/10.1128/JVI.01531-10>.
- Marsh, Mark, et Ari Helenius. 2006. « Virus Entry: Open Sesame ». *Cell* 124 (4): 729-40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.007>.
- McCaughey, C., X. Shi, R. M. Elliot, D. E. Wyatt, H. J. O'Neill, et P. V. Coyle. 1999. « Low PH-Induced Cytopathic Effect--a Survey of Seven Hantavirus Strains ». *Journal of Virological Methods* 81 (1-2): 193-97. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00042-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00042-7).

- McNulty, Shannon, Mike Flint, Stuart T. Nichol, et Christina F. Spiropoulou. 2013. « Host MTORC1 Signaling Regulates Andes Virus Replication ». *Journal of Virology* 87 (2): 912-22. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-12>.
- Meertens, Laurent, Athena Labeau, Ophelie Dejarnac, Sara Cipriani, Laura Sinigaglia, Lucie Bonnet-Madin, Tifenn Le Charpentier, *et al.* 2017. « Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses ». *Cell Reports* 18 (2): 324-33. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>.
- Moutailler, Sara, Ghazi Krida, Francis Schaffner, Marie Vazeille, et Anna-Bella Failloux. 2008. « Potential Vectors of Rift Valley Fever Virus in the Mediterranean Region ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 8 (6): 749-53. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0009>.
- Mudhasani, Rajini, Julie P. Tran, Cary Retterer, Sheli R. Radoshitzky, Krishna P. Kota, Louis A. Altamura, Jeffrey M. Smith, *et al.* 2013. « IFITM-2 and IFITM-3 but Not IFITM-1 Restrict Rift Valley Fever Virus ». *Journal of Virology* 87 (15): 8451-64. <https://doi.org/10.1128/JVI.03382-12>.
- Narayana, Sumudu K., Karla J. Helbig, Erin M. McCartney, Nicholas S. Eyre, Rowena A. Bull, Auda Eltahla, Andrew R. Lloyd, et Michael R. Beard. 2015. « The Interferon-Induced Transmembrane Proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 Inhibit Hepatitis C Virus Entry ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (43): 25946-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657346>.
- Navarro-Marí, José María, Begoña Palop-Borrás, Mercedes Pérez-Ruiz, et Sara Sanbonmatsu-Gámez. 2011. « Serosurvey Study of Toscana Virus in Domestic Animals, Granada, Spain ». *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (5): 583-87. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0065>.
- Neil, Stuart J. D., Trinity Zang, et Paul D. Bieniasz. 2008. « Tetherin Inhibits Retrovirus Release and Is Antagonized by HIV-1 Vpu ». *Nature* 451 (7177): 425-30. <https://doi.org/10.1038/nature06553>.
- Pépin, M., et avec la participation de la CIRE Réunion-Mayotte et l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). 2011. « [Rift Valley fever] ». *Medecine Et Maladies Infectieuses* 41 (6): 322-29. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2010.12.010>.
- Pepin, Michel, Michele Bouloy, Brian H. Bird, Alan Kemp, et Janusz Paweska. 2010. « Rift Valley Fever Virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): An Update on Pathogenesis, Molecular Epidemiology, Vectors, Diagnostics and Prevention ». *Veterinary Research* 41 (6): 61. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010033>.
- Perreira, Jill M., Christopher R. Chin, Eric M. Feeley, et Abraham L. Brass. 2013. « IFITMs Restrict the Replication of Multiple Pathogenic Viruses ». *Journal of Molecular Biology* 425 (24): 4937-55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.024>.
- Rolin, Alicia I., Lea Berrang-Ford, et Manisha A. Kulkarni. 2013. « The Risk of Rift Valley Fever Virus Introduction and Establishment in the United States and European Union ». *Emerging Microbes & Infections* 2 (12): e81. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.81>.

- Sakuma, Toshie, Takeshi Noda, Shuzo Urata, Yoshihiro Kawaoka, et Jiro Yasuda. 2009. « Inhibition of Lassa and Marburg Virus Production by Tetherin ». *Journal of Virology* 83 (5): 2382-85. <https://doi.org/10.1128/JVI.01607-08>.
- Savidis, George, Jill M. Perreira, Jocelyn M. Portmann, Paul Meraner, Zhiru Guo, Sharone Green, et Abraham L. Brass. 2016. « The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication ». *Cell Reports* 15 (11): 2323-30. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.074>.
- Schoggins, John W. 2019. « Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? » *Annual Review of Virology* 6 (1): 567-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>.
- Schoggins, John W., Sam J. Wilson, Maryline Panis, Mary Y. Murphy, Christopher T. Jones, Paul Bieniasz, et Charles M. Rice. 2011. « A Diverse Range of Gene Products Are Effectors of the Type I Interferon Antiviral Response ». *Nature* 472 (7344): 481-85. <https://doi.org/10.1038/nature09907>.
- Schreur, Paul J. Wichgers, et Jeroen Kortekaas. 2016. « Single-Molecule FISH Reveals Non-Selective Packaging of Rift Valley Fever Virus Genome Segments ». *PLOS Pathogens* 12 (8): e1005800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005800>.
- Schwartz, Olivier. 2004. « VIH-1 : un virus très Vif! » *médecine/sciences* 20 (2): 139-41. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004202139>.
- Schwarz, Kathleen B. 1996. « Oxidative Stress during Viral Infection: A Review ». *Free Radical Biology and Medicine* 21 (5): 641-49. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00131-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00131-1).
- Seth, Rashu B., Lijun Sun, Chee-Kwee Ea, et Zhijian J. Chen. 2005. « Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein That Activates NF- κ B and IRF3 ». *Cell* 122 (5): 669-82. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.012>.
- Sheehy, Ann M., Nathan C. Gaddis, Jonathan D. Choi, et Michael H. Malim. 2002. « Isolation of a Human Gene That Inhibits HIV-1 Infection and Is Suppressed by the Viral Vif Protein ». *Nature* 418 (6898): 646-50. <https://doi.org/10.1038/nature00939>.
- Shi, Guoli, Olivier Schwartz, et Alex A. Compton. 2017. « More than meets the I: the diverse antiviral and cellular functions of interferon-induced transmembrane proteins ». *Retrovirology* 14 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0377-y>.
- Smit, Jolanda M., Bastiaan Moesker, Izabela Rodenhuis-Zybert, et Jan Wilschut. 2011. « Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion ». *Viruses* 3 (2): 160-71. <https://doi.org/10.3390/v3020160>.
- Smith, S. E., M. S. Gibson, R. S. Wash, F. Ferrara, E. Wright, N. Temperton, P. Kellam, et M. Fife. 2013. « Chicken Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Restricts Influenza Viruses and Lyssaviruses In Vitro ». *Journal of Virology* 87 (23): 12957-66. <https://doi.org/10.1128/JVI.01443-13>.
- Spiegel, Martin, Teresa Plegge, et Stefan Pöhlmann. 2016. « The Role of Phlebovirus Glycoproteins in Viral Entry, Assembly and Release ». *Viruses* 8 (7). <https://doi.org/10.3390/v8070202>.
- Stremlau, Matthew, Michel Perron, Mark Lee, Yuan Li, Byeongwoon Song, Hassan Javanbakht, Felipe Diaz-Griffero, Donovan J. Anderson, Wesley I. Sundquist, et Joseph Sodroski. 2006. « Specific Recognition and Accelerated Uncoating of Retroviral Capsids by the TRIM5alpha

Restriction Factor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (14): 5514-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509996103>.

- Tartour, Kevin, Romain Appourchaux, Julien Gaillard, Xuan-Nhi Nguyen, Stéphanie Durand, Jocelyn Turpin, Elodie Beaumont, *et al.* 2014. « IFITM Proteins Are Incorporated onto HIV-1 Virion Particles and Negatively Imprint Their Infectivity ». *Retrovirology* 11 (novembre): 103. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0103-y>.
- Tartour, Kevin, et Andrea Cimorelli. 2015. « [IFITM, a common barrier to many viruses] ». *Médecine sciences : M/S* 31 (avril): 377-82. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153104011>.
- Tartour, Kevin, Xuan-Nhi Nguyen, Romain Appourchaux, Sonia Assil, Véronique Barateau, Louis-Marie Bloyet, Julien Burlaud Gaillard, *et al.* 2017. « Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs ». *PLoS Pathogens* 13 (9): e1006610. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006610>.
- Valassina, Marcello, Maria Grazia Cusi, et Pier Egisto Valensin. 2003. « A Mediterranean Arbovirus: The Toscana Virus ». *Journal of NeuroVirology* 9 (6): 577-83. <https://doi.org/10.1080/13550280390247678>.
- Valle, Tânia Zaverucha do, Agnès Billecocq, Laurent Guillemot, Rudi Alberts, Céline Gomet, Robert Geffers, Kátia Calabrese, *et al.* 2010a. « A New Mouse Model Reveals a Critical Role for Host Innate Immunity in Resistance to Rift Valley Fever ». *The Journal of Immunology*, octobre. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000949>.
- Veer, M. J. de, M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J. M. Paranjape, R. H. Silverman, et B. R. Williams. 2001. « Functional Classification of Interferon-Stimulated Genes Identified Using Microarrays ». *Journal of Leukocyte Biology* 69 (6): 912-20.
- Wang, Anqi, Lipei Sun, Mingshu Wang, Renyong Jia, Dekang Zhu, Mafeng Liu, Kunfeng Sun, *et al.* 2017. « Identification of IFITM1 and IFITM3 in Goose: Gene Structure, Expression Patterns, and Immune Responses against Tembusu Virus Infection ». Research Article. BioMed Research International. Hindawi. 13 mars 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5149062>.
- Wang, Song, Xiaojuan Chi, Haitao Wei, Yuhai Chen, Zhilong Chen, Shile Huang, et Ji-Long Chen. 2014. « Influenza A Virus-Induced Degradation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B Contributes to Viral Replication by Suppressing IFITM3 Protein Expression ». *Journal of Virology* 88 (15): 8375-85. <https://doi.org/10.1128/JVI.00126-14>.
- Wang, Yimeng, Qinghua Pan, Shilei Ding, Zhen Wang, Jingyou Yu, Andrés Finzi, Shan-Lu Liu, et Chen Liang. 2017. « The V3 Loop of HIV-1 Env Determines Viral Susceptibility to IFITM3 Impairment of Viral Infectivity ». *Journal of Virology* 91 (7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02441-16>.
- Weidner, Jessica M., Dong Jiang, Xiao-Ben Pan, Jinhong Chang, Timothy M. Block, et Ju-Tao Guo. 2010. « Interferon-Induced Cell Membrane Proteins, IFITM3 and Tetherin, Inhibit Vesicular Stomatitis Virus Infection via Distinct Mechanisms ». *Journal of Virology* 84 (24): 12646-57. <https://doi.org/10.1128/JVI.01328-10>.

- Weston, Stuart, Stephanie Czieso, Ian J. White, Sarah E. Smith, Rachael S. Wash, Carmen Diaz-Soria, Paul Kellam, et Mark Marsh. 2016. « Alphavirus Restriction by IFITM Proteins ». *Traffic* 17 (9): 997-1013. <https://doi.org/10.1111/tra.12416>.
- Wilkins, Courtney, Jessica Woodward, Daryl T.-Y. Lau, Amy Barnes, Michael Joyce, Nicola McFarlane, Jane A. McKeating, D. Lorne Tyrrell, et Michael Gale. 2013. « IFITM1 is a tight junction protein that inhibits hepatitis C virus entry », *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (2): 461-69. <https://doi.org/10.1002/hep.26066>.
- Wilkins, Jordan, Yi-Min Zheng, Jingyou Yu, Chen Liang, et Shan-Lu Liu. 2016. « Nonhuman Primate IFITM Proteins Are Potent Inhibitors of HIV and SIV ». *PLOS ONE* 11 (6): e0156739. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156739>.
- Won, Sungyong, Tetsuro Ikegami, C. J. Peters, et Shinji Makino. 2007. « NSm Protein of Rift Valley Fever Virus Suppresses Virus-Induced Apoptosis ». *Journal of Virology* 81 (24): 13335-45. <https://doi.org/10.1128/JVI.01238-07>.
- Wuerth, Jennifer Deborah, et Friedemann Weber. 2016. « Phleboviruses and the Type I Interferon Response ». *Viruses* 8 (6). <https://doi.org/10.3390/v8060174>.
- Wyles, Jessica P., C. McMaster, et N. Ridgway. 2002. « Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein-A (VAP-A) Interacts with the Oxysterol-binding Protein to Modify Export from the Endoplasmic Reticulum* ». *The Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201191200>.
- Xie, Maorong, Baoqin Xuan, Jiaoyu Shan, Deng Pan, Yamei Sun, Zhao Shan, Jinping Zhang, Dong Yu, Bin Li, et Zhikang Qian. 2015. « Human Cytomegalovirus Exploits Interferon-Induced Transmembrane Proteins To Facilitate Morphogenesis of the Virion Assembly Compartment ». *Journal of Virology* 89 (6): 3049-61. <https://doi.org/10.1128/JVI.03416-14>.
- Yu, Jingyou, Minghua Li, Jordan Wilkins, Shilei Ding, Talia H. Swartz, Anthony M. Esposito, Yi-Min Zheng, et al. 2015. « IFITM Proteins Restrict HIV-1 Infection by Antagonizing the Envelope Glycoprotein ». *Cell Reports* 13 (1): 145-56. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.055>.
- Zaitseva, Elena, Sung-Tae Yang, Kamran Melikov, Sergei Pourmal, et Leonid V. Chernomordik. 2010. « Dengue Virus Ensures Its Fusion in Late Endosomes Using Compartment-Specific Lipids ». *PLOS Pathogens* 6 (10): e1001131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001131>.
- Zhang, Zhao, Jun Liu, Meng Li, Hui Yang, et Chiyu Zhang. 2012. « Evolutionary Dynamics of the Interferon-Induced Transmembrane Gene Family in Vertebrates ». *PloS one* 7 (novembre): e49265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049265>.
- Zhao, Jun, Shanping He, Arlet Minassian, Junhua Li, et Pinghui Feng. 2015. « Recent advances on viral manipulation of NF- κ B signaling pathway ». *Current opinion in virology* 15 (décembre): 103-11. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.013>.
- Zhao, Xuesen, Fang Guo, Fei Liu, Andrea Cuconati, Jinhong Chang, Timothy M. Block, et Ju-Tao Guo. 2014. « Interferon Induction of IFITM Proteins Promotes Infection by Human Coronavirus OC43 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (18): 6756-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320856111>.

- Zhao, Xuesen, Jiarui Li, Cheryl A. Winkler, Ping An, et Ju-Tao Guo. 2019. « IFITM Genes, Variants, and Their Roles in the Control and Pathogenesis of Viral Infections ». *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03228>.
- Zhao, Xuesen, Mohit Sehgal, Zhifei Hou, Junjun Cheng, Sainan Shu, Shuo Wu, Fang Guo, *et al.* 2018a. « Identification of Residues Controlling Restriction versus Enhancing Activities of IFITM Proteins on Entry of Human Coronaviruses ». *Journal of Virology* 92 (6). <https://doi.org/10.1128/JVI.01535-17>.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Tartour *et al.* 2017



RESEARCH ARTICLE

Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs

Kevin Tartour^{1,2,3,4,5,6†}, Xuan-Nhi Nguyen^{1,2,3,4,5,6†}, Romain Appourchau^{1,2,3,4,5,6†},
Sonia Assil^{1,2,3,4,5,6†}, Véronique Barateau^{1,2,3,4,5,6†}, Louis-Marie Bloyet^{1,2,3,4,5,6†},
Julien Burlaud Gaillard^{7,8†}, Marie-Pierre Confort^{9†}, Beatriz Escudero-Perez^{1,2,3,4,5,6†},
Henri Gruffat^{1,2,3,4,5,6†}, Saw See Hong^{9†}, Marie Moroso^{1,2,3,4,5,6,10†}, Olivier Reynard^{1,2,3,4,5,6†},
Stéphanie Reynard^{1,2,3,4,5,6,11†}, Elodie Decembre^{1,2,3,4,5,6}, Najate Ftaich⁹,
Axel Rossi^{1,2,3,4,5,6}, Nannan Wu^{1,2,3,4,5,6,12}, Frédérick Arnaud⁹, Sylvain Baize^{1,2,3,4,5,6,11},
Marlène Dreux^{1,2,3,4,5,6}, Denis Gerlier^{1,2,3,4,5,6}, Glaucia Paranhos-Baccala^{1,2,3,4,5,6,10},
Viktor Volchkov^{1,2,3,4,5,6}, Philippe Roingard^{7,8}, Andrea Cimarelli^{1,2,3,4,5,6*}









ANNEXE 2 : Alexander *et al.* 2020



Article

Development of a Reverse Genetics System for Toscana Virus (Lineage A)

Akira J. T. Alexander^{1,*} , Marie-Pierre Confort², Sophie Desloire², James I. Dunlop¹,
Srikeerthana Kuchi¹, Vattipally B. Sreenu¹ , Daniel Mair¹, Gavin S. Wilkie¹,
Ana Da Silva Filipe¹ , Benjamin Brennan¹ , Maxime Ratinier² , Frédérick Arnaud^{2,*} 
and Alain Kohl^{1,*}