



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 6281

To cite this version :

Dhondt, Kévin. *Mise en place d'un nouveau modèle animal pour l'étude de la pathogenèse du virus Nipah : utilisation de souris transgéniques déficientes pour le gène du récepteur à l'interféron de type 1*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2011, 95 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

MISE EN PLACE D'UN NOUVEAU MODELE ANIMAL POUR L'ETUDE DE LA PATHOGENESE DU VIRUS NIPAH

UTILISATION DE SOURIS TRANSGENIQUES DEFICIENTES POUR LE GENE
DU RECEPTEUR A L'INTERFERON DE TYPE I

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

DHONDT Kévin, Pierre, Louis

Né, le 12 Juin 1986 à VENISSIEUX (69)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

Mme Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAUX	M. ECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1^o CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2^o CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

N. PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

N. MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

N. MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
M. **DASTE Thomas**, *Urgences-soins intensifs*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Virologie

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

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Stéphane BERTAGNOLI

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie

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

En remerciement de sa disponibilité et de toute l'énergie qu'il consacre à ses étudiants,

Hommages respectueux.

Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie

En remerciement de son enseignement et de sa présence dans notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à ma famille.

A mes parents, qui m'ont soutenu tout au long de ma scolarité et m'ont toujours encouragé à aller de l'avant malgré les difficultés. Merci pour vos conseils avisés et votre amour. Je suis fier d'être votre fils. Merci.

A mes grands-parents maternels ; Mamette, qui m'a transmis son sens de l'ambition, du perfectionnisme, de la ténacité et du courage et Papy, qui aurait été fier de voir où je suis arrivé aujourd'hui.

A mes grands-parents paternels ; Bon Papa, qui m'a fait aimer la ville de Lyon quand j'étais petit et qui me fait maintenant aimer sa gastronomie et Bonne Maman, qui se serait réjouie de ma réussite.

A mon frère et ma sœur, qui ont veillés à ce que je ne prenne pas la grosse tête. Restez comme vous êtes !

A Julie, qui partage ma vie, mon caractère et mes projets. Je suis heureux quand tu es à mes côtés et je souhaite qu'il en soit toujours ainsi.

A ma belle-famille, qui m'a accueilli les bras ouverts dans sa tribu et veille avec soin sur mon régime alimentaire à base de Saint-Genix, ravioles et Saint-Marcellin.

Mes remerciements vont ensuite à mes enseignants.

Au Docteur Stéphane Bertagnoli, enseignant de virologie, qui a toujours été là pour m'aider dans mon parcours « hors cadre » et a toujours trouvé du temps pour me guider dans les méandres parfois obscurs des institutions. C'est grâce à vous que je me suis passionné pour la virologie. Merci de faire votre métier avec tant d'enthousiasme et de pédagogie.

Au Docteur Séverine Boullier, enseignant d'immunologie, qui m'a aidé à décrocher le sujet de cette thèse et celui de ma future thèse universitaire. Merci pour votre gentillesse, votre pédagogie et vos enseignements.

Au Docteur Patrick Verwaerde, enseignant d'anesthésie-réanimation-urgences, qui a bien failli réussir à me faire prendre le métier d'urgentiste. Tu es un modèle de dignité.

A Françoise Michaud et Benoit Séverac, enseignants d'anglais, qui m'ont apporté leur soutien de façon bienveillante et systématique.

Au Professeur Alain Milon, Directeur, pour m'avoir appris à montrer les dents tout en continuant à sourire ...

Je remercie aussi mes amis.

Aux internes de Champollion, qui ont fait de mes années de prépa les plus belles années de ma scolarité.

A Victor, compagnon de galère et solide gaulois ! Nous nous sommes soutenus depuis maintenant 7 ans et cela continuera ainsi ! Les deux vétos de la bande des internes ont encore de belles aventures à vivre !

A Justine, pour ta franchise sans détour, tes coups de gueule souvent justifiés et ton amitié qui m'est précieuse.

A Valentine, pour tes prises de têtes qui arrivent à t'enflammer sur un détail, nos séances psy et les fous rires qui vont avec ! Ne change surtout pas !

A mon groupe de TP : Vanessa, Anne-Laure, Geoffrey, Sophia, on en aura bien bavé mais ça valait largement le coup ! Vous êtes loin (ou c'est moi qui suis loin, mais ça revient au même !) et pourtant vous trottez toujours dans un coin de ma tête.

A mon groupe de Docteurs : Christelle, Audrey, Coralie, Manue, Marie et Claire pour les souvenirs du meilleur accueil rattrapé *in extremis*, d'une revue pleine de « ver »tus qui nous aura fait « vers »er une petite larme et surtout pour les hôpitaux de bovine, moments magiques de craquage !!!

A mes poulots : Marlène, Marion, Justine, Alma, Audrey, Thibaud et Guillaume parce que vous êtes forcément les meilleurs poulots du monde !

Je remercie enfin les membres de mon laboratoire d'accueil.

Au Docteur Branka Horvat, directeur de recherche à l'INSERM, qui a choisi de me faire confiance et m'a offert l'opportunité de travailler sur ce projet.

A Cyrille Mathieu, qui m'a tout appris sur le travail de laboratoire et qui a réalisé pour cette thèse toutes les expériences dans le laboratoire P4. Merci pour ta patience, ta disponibilité et ta gentillesse. Cette rencontre est le départ d'une belle amitié qui marquera ma carrière de scientifique.

Aux autres membres de l'équipe U758-INSERM, toujours disponibles pour un conseil ou pour un coup de main.

Sommaire

INTRODUCTION	13
PARTIE I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE VIRUS NIPAH.....	16
I. GENERALITES SUR LE VIRUS NIPAH	16
A. <i>Historique</i>	16
B. <i>Classification et nomenclature</i>	18
C. <i>Caractéristiques structurales et moléculaires du virus Nipah</i>	20
1. Morphologie	20
2. Organisation génomique et protéique	21
a. Les protéines structurales.....	21
b. Les protéines non-structurales.....	23
3. Le cycle de réplication virale	26
D. <i>Pathogénie</i>	27
1. Voies d'entrée et dissémination du virus	27
2. Cellules cibles et récepteurs d'entrée	28
II. EPIDEMIOLOGIE.....	29
A. <i>Espèces cibles</i>	29
1. Les chauves-souris	29
2. Les porcs	31
3. Les hommes.....	32
4. Les animaux domestiques	33
5. Les modèles animaux expérimentaux.....	34
B. <i>Aire de répartition géographique</i>	36
C. <i>Transmission à l'homme</i>	37
1. Transmission aérosol.....	37
2. Transmission porcine.....	37
3. Transmission interhumaine.....	37
4. Contamination alimentaire.....	38
III. TABLEAU CLINIQUE.....	40
A. <i>Symptômes</i>	40
1. Chez la chauve-souris frugivore (<i>Pteropus sp</i>)	40
2. Chez le porc	40

a.	Porcelets avant sevrage (< 4 semaines).....	40
b.	Porcelets au sevrage (> 4 semaines) et à l'engraissement (< 6 mois).....	40
c.	Truies et verrats reproducteurs.....	41
3.	Chez l'homme.....	41
4.	Autres.....	44
<i>B.</i>	<i>Lésions</i>	45
1.	Macroscopiques.....	45
2.	Microscopiques.....	46
IV.	DIAGNOSTIC DE CERTITUDE EN LABORATOIRE.....	48
<i>A.</i>	<i>Identification de l'agent pathogène</i>	48
1.	Isolement du virus et caractérisation.....	48
a.	Echantillonnage et traitement des échantillons.....	49
b.	Isolement en culture de cellules.....	49
c.	Méthodes d'identification.....	50
2.	Test de séroneutralisation virale : différenciation entre virus Hendra et virus Nipah.....	51
a.	Réduction du nombre de plages.....	52
b.	Neutralisation par microtitrage.....	52
c.	Coloration immunologique des plages.....	53
3.	Méthodes de reconnaissance basée sur les acides nucléiques.....	53
4.	Détection d'antigènes d'Henipavirus dans des tissus fixés pour immuno-histochimie.....	54
<i>B.</i>	<i>Epreuves sérologiques</i>	54
1.	Test de séroneutralisation du virus.....	55
2.	Épreuves immuno-enzymatiques.....	55
V.	PROPHYLAXIE.....	56
<i>A.</i>	<i>Prophylaxie socio-environnementale</i>	56
<i>B.</i>	<i>Prophylaxie sanitaire</i>	57
<i>C.</i>	<i>Prophylaxie médicale</i>	58
VI.	CONTEXTE D'ETUDE.....	58
<i>A.</i>	<i>Classification du virus au niveau 4 de biosécurité</i>	58
<i>B.</i>	<i>Le travail en conditions P4</i>	59
<i>C.</i>	<i>Homologie entre souches virales malaisienne et bangladaise</i>	60
<i>D.</i>	<i>Les enjeux économiques liés aux épidémies de virus Nipah</i>	60

E. Utilisation du virus Nipah comme agent de bioterrorisme	61
--	----

PARTIE II. ETUDE EXPERIMENTALE : VERS LA DETERMINATION D'UN NOUVEAU

MODELE ANIMAL	62
I. INTERETS ET LIMITES DES MODELES ANIMAUX EXISTANTS.....	62
A. <i>Les primates non-humains</i>	62
1. Le singe vert africain (<i>Chlorocebus aethiops</i>).....	62
2. Le saïmiri (<i>Saimiri sciureus</i>)	64
B. <i>Le hamster doré (Mesocricetus auratus)</i>	64
II. LA SOURIS TRANSGENIQUE IFNAR KO.....	65
III. MATERIEL ET METHODES	66
A. <i>Infection des souris</i>	66
B. <i>Histologie et immunohistochimie</i>	67
C. <i>PCR quantitative par transcription inverse</i>	68
D. <i>Test de séroneutralisation</i>	69
IV. VALIDATION DU MODELE	69
A. <i>A l'échelle macroscopique</i>	69
1. Etude des signes cliniques	69
2. Suivi de la mortalité	70
3. Examen nécropsique	73
B. <i>A l'échelle microscopique</i>	74
C. <i>A l'échelle moléculaire</i>	78
D. <i>Test de séroneutralisation</i>	79
V. DISCUSSION.....	80
CONCLUSION	84

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation des premières épidémies liées au virus Nipah en Malaisie et à Singapour entre septembre 1998 et avril 1999.	16
Figure 2 : Chronologie et localisation des cas humains d'infection par le virus Nipah déclarés par les autorités malaisiennes entre octobre 1998 et avril 1999.....	18
Figure 3 : Classification des Paramyxovirinae d'après le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV).	19
Figure 4 : Image de microscopie électronique du virus Nipah montrant les projections sur l'enveloppe et la nucléocapside en chevrons	20
Figure 5 : Organisation génomique du virus Nipah et structure des virions.	23
Figure 6 : Voies d'inhibition de la réponse interféron par les protéines non structurales des Paramyxoviridae.	25
Figure 7 : Mécanique répliquative du virus Nipah.....	26
Figure 8 : Modèle de dissémination du virus Nipah utilisant les leucocytes.	27
Figure 9 : Immunomarquage positif des antigènes du virus Nipah dans les axones du nerf olfactif. Coupe transversale des cornets nasaux.....	28
Figure 10 : Colonie de Pteropus giganteus au Sri-Lanka..	31
Figure 11 : Répartition géographique des épidémies de virus Nipah et des chauves-souris frugivores de la famille des Pteropodidae.....	36
Figure 12 : Mode opératoire pour la collecte de sirop de palme.	39
Figure 13 : Chauves-souris surprises en train de lécher et d'uriner dans la sève collectée	39
Figure 14 : Radiographies pulmonaires de 4 patients, montrant une opacité diffuse bilatérale couvrant la majorité des poumons, compatibles avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë..	43
Figure 15 : Image par résonance magnétique du cerveau d'un homme malaisien de 44 ans atteint par le virus Nipah.	45
Figure 16 : Image par résonance magnétique du cerveau d'une femme bangladaise de 36 ans atteinte par le virus Nipah..	46
Figure 17 : Syncytium observé dans le tissu pulmonaire d'un porc infecté par le virus Nipah.	47

Figure 18 : Vascularite dans un vaisseau pulmonaire humain.....	47
Figure 19 : Natte de bambou couvrant le dispositif destiné à récolter le sirop de palme et empêchant l'accès des chauves-souris.	57
Figure 20 : [A] Sécrétions mousseuses sanguinolentes autour des narines et de la bouche. [B] Poumons hypertrophiés avec de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées.	63
Figure 21 : [A] Cerveau présentant une congestion sévère avec de possibles hémorragies méningées. Fluide suggérant l'existence d'un œdème modéré des méninges. [B] Double marquage d'un vaisseau sanguin cérébral montrant la colocalisation du virus Nipah dans les cellules endothéliales	63
Figure 22 : Variation journalière individuelle du poids des souris IFNAR KO utilisées pour la détermination de la D.L. ₅₀ et infectées i.p. avec 5.10^4 ufp de virus Nipah.....	70
Figure 23 : Suivi de la mortalité des souris de souche sauvage C57BL/6 infectées par voie intracérébrale ou intrapéritonéale avec 5.10^5 ufp de virus Nipah.....	71
Figure 24 : Suivi de la mortalité des souris IFNAR KO infectées par voie intracérébrale, intrapéritonéale ou intranasale avec 5.10^5 ufp de virus Nipah.	72
Figure 25 : Détermination de la dose létale 50% du virus Nipah inoculé par voie intrapéritonéale chez la souris IFNAR KO..	73
Figure 26 : Pathologie liée à l'infection aiguë par le virus Nipah dans le cerveau de souris IFNAR KO infectées par 5.10^4 ufp par voie intrapéritonéale.....	74
Figure 27 : Immunohistochimie dirigée contre les antigènes du virus Nipah sur des tissus de souris IFNAR KO infectées avec 5.10^4 ufp par voie i.p.	76
Figure 28 : Comparaison histopathologique de différents tissus issus de souris IFNAR KO infectées (5.10^4 ufp i.p.) ou de souris IFNAR KO témoins.	76
Figure 29 : Amplification des produits d'ARN spécifiques de la nucléocapside du virus Nipah par RT-qPCR..	78
Figure 30 : Test de séroneutralisation contre le virus Nipah... ..	79

Table des tableaux

Tableau 1 : Séroprévalence du virus Nipah au sein des espèces de chauves-souris frugivores d'Asie du Sud-est.....	30
Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah chez l'homme d'après [60].....	41
Tableau 3 : Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque (OMS) [104]	59
Tableau 4 : Homologie prédictive des différentes protéines virales entre les souches malaisiennes et bangladaises du virus Nipah [105].	60
Tableau 5 : Signes cliniques observés chez les souris IFNAR KO infectées par le virus Nipah.	70

Introduction

L'étude des maladies infectieuses émergentes et ré-émergentes constitue actuellement l'un des enjeux majeurs de santé publique mondiale. Parmi les acteurs impliqués dans ce domaine, les vétérinaires forment une pierre angulaire de l'édifice, entre le biologiste et le médecin, à l'interface entre l'homme et l'animal. En effet, on estime que 70% de ces maladies ont une origine zoonotique, plaçant de fait le vétérinaire comme interlocuteur de choix auprès des autorités scientifiques, économiques et politiques mondiales. Si l'on compte quelques ré-émergences bactériennes (Fièvre charbonneuse, *Bacillus anthracis*; Leptospirose, *Leptospira sp* ; etc...) et parasitaires (Cryptosporidiose, *Cryptosporidium sp.* ; Anisakiase, *Anisakis sp.* ; etc...), les émergences virales représentent la majorité des maladies infectieuses ainsi qualifiées. Parmi celles-ci, on retrouve majoritairement des virus à ARN, provenant de familles à large spectre d'hôtes. Les virus Nipah et Hendra forment un cas assez particulier à cette règle. Classés dans un genre nouveau de la famille des *Paramyxoviridae*, ces deux Henipavirus (nom formé de la contraction des 2 noms) possèdent un spectre d'hôte particulièrement large pour cette famille. En effet, les virus de cette famille bien connue sont généralement très bien adaptés à leurs hôtes naturels : les virus de la rougeole et des oreillons pour l'homme, de la maladie de Carré pour les carnivores ou encore de la maladie de Newcastle chez la volaille. Ils ne représentaient pas, à priori, une menace zoonotique majeure jusqu'à la découverte du genre *Henipavirus*.

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

L'étude des *Henipavirus* implique l'utilisation de modèles animaux adaptés afin d'obtenir un maximum de renseignements tout en limitant leur utilisation pour des raisons éthiques, économiques mais aussi de sécurité. Bien que le virus Nipah soit capable d'infecter un grand nombre d'hôtes, il est cependant difficile de trouver un modèle animal mimant parfaitement le comportement du virus chez l'homme. Le singe reste à l'heure actuelle le meilleur modèle car il présente l'ensemble des signes cliniques observés chez l'homme [1–3]. Néanmoins, l'utilisation de modèles primates non humains pose un problème éthique important. C'est pourquoi il convient d'en limiter à tout prix l'emploi. Le modèle le plus utilisé est donc un modèle rongeur, le hamster doré [4]. L'utilisation de hamsters présente de nombreux avantages avec notamment un encombrement et un coût réduit, une dose infectieuse extrêmement faible de seulement 7 unités formant plaque (ufp) [5] et une pathologie neurologique très similaire à celle de l'homme. Cependant, si le modèle hamster a apporté de nombreuses avancées concernant l'étude de la pathologie liée à l'infection par le virus Nipah, la dissection des mécanismes physio- et immuno-pathologiques sous-jacents se révèle particulièrement difficile en l'absence de connaissances et d'outils spécialement développés pour cet animal. En effet, la majorité des études d'immunobiologie virale sont réalisées chez le rat et la souris. Chez ces espèces, la communauté scientifique possède un séquençage complet du génome et de nombreux outils (anticorps, transgénèse, drogues, ...) qui permettent d'analyser, dans le détail, les phénomènes physiopathologiques impliqués lors de l'infection virale.

Bien que les cellules murines expriment Ephrine B2 et Ephrine B3 (les récepteurs d'entrée au virus Nipah [6]), une étude réalisée en 2003 a montré que les souris n'étaient pas susceptibles à l'infection [4]. **Dans cette thèse, nous proposons un nouveau modèle murin basé sur l'utilisation de souris transgéniques déficientes pour le récepteur à l'interféron de type I (IFNAR).** En effet, la réponse interféron de type I est une réponse immunitaire innée antivirale déclenchée dans une très large majorité de cellules lors d'une infection par un virus. Elle repose sur la détection de signaux de danger (les Pathogens Associated Molecular Patterns – PAMPs) par des récepteurs cellulaires membranaires ou cytoplasmiques (les Pathogens Recognition Receptors – PRRs). Dans le cas du virus Nipah, les ARN viraux double ou simple brin représentent des PAMPs capables d'activer respectivement les Toll-Like Receptors (TLR) membranaires 3 et 7-8 ainsi que les hélicases cytoplasmiques RIG-I et MDA5 qui activent la synthèse d'interféron de type I. La réponse

interféron s'organise alors au niveau tissulaire par un système d'auto-amplification et d'activation des cellules voisines par l'intermédiaire du récepteur IFNAR. Dans le modèle murin transgénique que nous présentons (IFNAR KO), la production d'interféron de type I n'est donc pas complètement abolie mais très fortement bridée. Un tel modèle nous permet donc d'identifier dans quelles mesures la production d'interféron est un facteur responsable de la résistance naturelle des souris de souches sauvages lors de l'infection par le virus Nipah.

Partie I. Etude bibliographique sur le virus Nipah

I. Généralités sur le virus Nipah

A. Historique

Le premier cas documenté d'infection par le virus Nipah a été identifié fin septembre 1998 en Malaisie dans le petit village d'Ampang (District de Kinta). Il fait suite à l'apparition soudaine et simultanée de quelques encéphalites létales parmi les fermiers et leurs familles, ainsi que des symptômes respiratoires et neurologiques largement répandus au sein du cheptel porcin du village [7]. Le virus se dissémine rapidement et atteint les villages d'Ulu Piah et Tambun eux-aussi proches de la ville d'Ipoh (région de Perak) où il sévit jusqu'en février 1999. Parallèlement à cette épidémie, deux autres clusters d'infection apparaissent autour de la ville de Sikamat (région de Negeri Sembilan) entre décembre 1998 et janvier 1999 et de la ville de Bukit Pelandok (région de Negeri Sembilan) entre décembre 1998 et avril 1999. Deux cas sont aussi identifiés pendant cette période dans la région de Selangor (Figure 1).



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

Au début des épidémies, les autorités pensaient avoir affaire au virus de l'encéphalite japonaise, assez fréquent dans cette région. Néanmoins, seul un patient sur les 13 premiers cas était positif pour ce virus. Des études de microscopie électronique sur des échantillons de patients infectés permettent alors la mise en évidence de structures virales similaires à celles observées chez les paramyxovirus. C'est par immunohistochimie que les scientifiques malaisiens identifient ce virus comme apparenté au virus Hendra [8], découvert 4 ans plus tôt, en 1994, en Australie. Le virus n'est isolé qu'en mars 1999 à partir d'un échantillon de système nerveux central humain issu d'un patient décédé et doit son nom à celui du village d'où provenait le patient, Kampung Sungai Nipah [9]. Le séquençage du virus alors réalisé montre effectivement des similarités avec le virus Hendra, mais il s'agit néanmoins d'un virus tout à fait inconnu. Les virus Hendra et Nipah sont alors classés dans un nouveau genre, les *Henipavirus*, qui représentent un groupe de virus émergents à large spectre d'hôtes au sein de la famille des *Paramyxoviridae*.

S'il a fallu attendre 1999 pour identifier le virus Nipah, son émergence a pu être rétrospectivement datée de 1996 à partir de tissus de porcs morts dans la région d'Ipoh. Il semblerait que l'ensemble des cas malaisiens soient originaires de cet endroit et que le virus se soit disséminé via le transport de porcs d'engraissement infectés. De plus, suite à une erreur initiale de diagnostic, les porcs avaient été vaccinés contre le virus de l'encéphalite japonaise ; la réutilisation des aiguilles et seringues lors de cette vaccination de masse est un des facteurs qui a contribué à la dissémination rapide du virus Nipah [10]. Parallèlement aux épidémies malaisiennes, une autre épidémie est identifiée entre le 9 et le 19 mars 1999 à Singapour parmi 11 employés d'abattoir ayant travaillé sur des porcs malaisiens infectés [11].

A partir du 20 mars 1999, les autorités malaisiennes décrètent l'arrêt des transports de porcs et leur abattage massif dans un rayon de 10 km autour de chaque ferme infectée [8]. Au moment des faits, la péninsule malaisienne comptait 2,4 millions de porcs répartis dans près de 1800 fermes. Au 21 juillet 1999, 1,1 millions de porcs avaient été abattus et 956 fermes entièrement détruites [9]. Malgré la contrebande liée à de mauvaises compensations pour les éleveurs [12], l'OMS déclare les épidémies malaisiennes et singapourienne terminées en mai 1999. Entre 1998 et 1999, les autorités malaisiennes ont recensé un total de 265 cas humains confirmés dont 105 décès [13] (Figure 2).

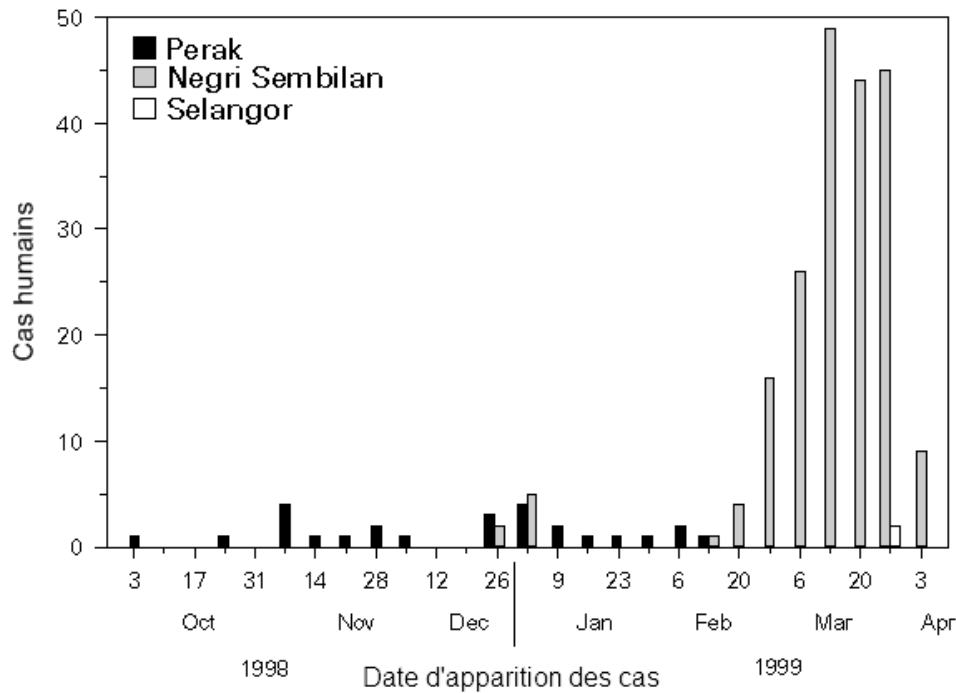


Figure 2 : Chronologie et localisation des cas humains d'infection par le virus Nipah déclarés par les autorités malaisiennes entre octobre 1998 et avril 1999. Adapté à partir de [8].

Alors que l'on pensait avoir contrôlé l'émergence de ce virus en Malaisie et à Singapour, le virus Nipah réapparaît en janvier et février 2001 dans la ville de Siliguri en Inde (région du Bengale de l'Ouest) et au Bangladesh [14,15]. Les flambées épidémiques ne touchent qu'un petit nombre de personnes (souvent entre 5 et 30) avant de s'éteindre d'elles-mêmes mais ré-émergent chaque année. Ainsi, au Bangladesh, entre la première émergence de 2001 et les épidémies de 2011, on recense une quinzaine d'épidémies majeures ayant fait un total de 111 morts jusqu'en 2010 [16] et 35 morts supplémentaires en 2011.

B. Classification et nomenclature

Le virus Nipah fait partie du genre des *Henipavirus*, de la sous-famille des *Paramyxovirinae*, de la famille des *Paramyxoviridae* de l'ordre des *Mononegavirales* (cf. Figure 3).

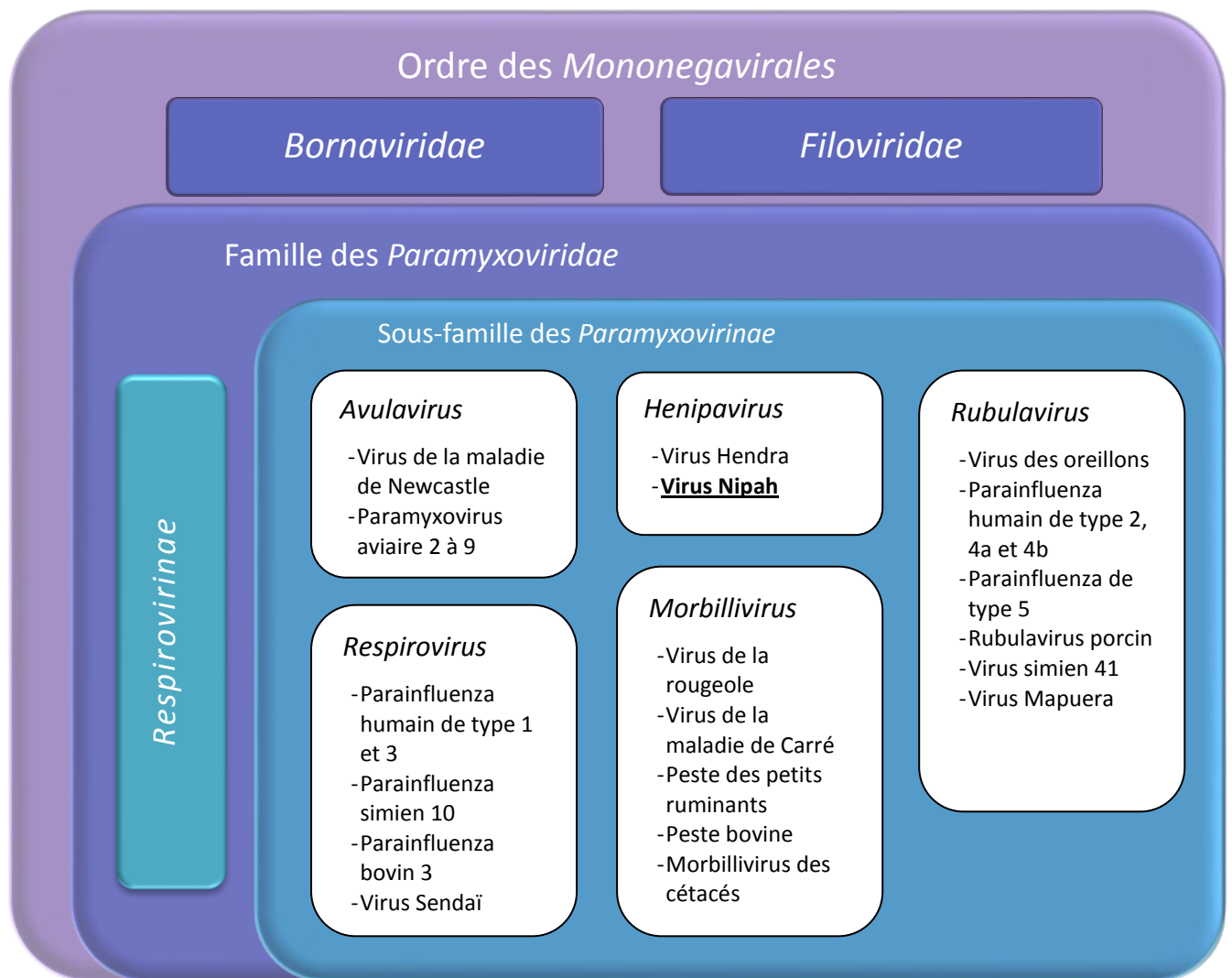


Figure 3 : Classification des Paramyxovirinae d'après le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) [17].

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

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

genre des *Henipavirus* a été créé en 2002 suite à l'impossibilité de regrouper les virus Hendra et Nipah dans l'un des genres déjà existant [18]. En effet, les séquences non traduites en 3' (*leader*) et en 5' (*trailer*) du genre des *Henipavirus* sont uniques [19]. La taille du génome viral des *Henipavirus* est plus grande d'environ 2700 nucléotides (soit 15%) par rapport aux autres *Paramyxoviridae* [20]. Néanmoins, la taille des protéines (exceptée la protéine P qui est plus longue d'environ 200 acides aminés) est relativement similaire avec celle des *Respirovirus* et *Morbillivirus*. Cette incohérence entre la taille du génome et celle des protéines s'explique par la présence de régions non traduites en partie 3' de chaque unité de transcription (à l'exception de L) qui constituent un caractère unique au sein des *Paramyxoviridae* [21].

C. Caractéristiques structurales et moléculaires du virus Nipah

1. Morphologie

Les Henipavirus sont des virus de type pléiomorphe. Leur forme peut être sphérique ou filamenteuse, et leur taille peut varier d'environ 50 à 150 nm [22].

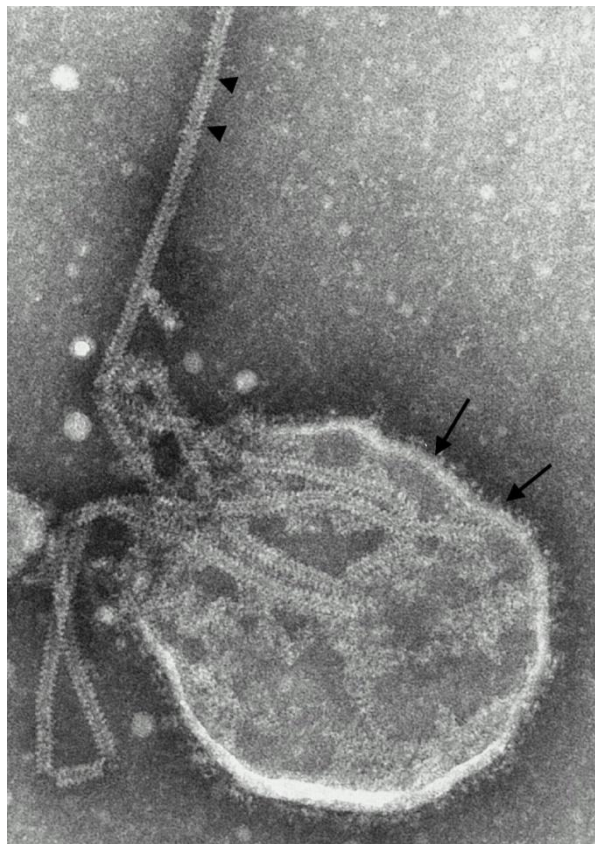


Figure 4 : Image de microscopie électronique du virus Nipah montrant les projections sur l'enveloppe (flèches) et la nucléocapside en chevrons (triangles). D'après [23].

Les études de microscopie électronique montrent des images de virions enveloppés dont la surface est bordée par de petites projections d'environ 17 nm [24]. La morphologie en chevrons des filaments de nucléocapside (cf. Figure 4), constituée de l'association de la protéine virale N et de l'ARN génomique viral, constitue un élément caractéristique de la famille des *Paramyxoviridae*.

2. Organisation génomique et protéique

a. Les protéines structurales

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

La protéine de nucléocapside N est longue de 532 acides aminés pour une masse moléculaire de 58 kDa. Lors de sa polymérisation, les protéines N s'organisent en une spirale de chevrons de 18 nm avec une période de 5 nm [25]. Cette spirale constitue le squelette protéique de la nucléocapside dans lequel l'ARN viral vient se loger pour limiter sa dégradation. La protéine N possède aussi des domaines d'interaction lui permettant d'interagir avec les phosphoprotéines (P) [26] et la polymérase (L) afin d'optimiser la protection, la réplication et la transcription du virus. La composition de cette protéine est peu semblable à celles des autres *Paramyxoviridae* (20 à 30% de similarité) mais il existe un domaine de 212 acides aminés (entre l'acide aminé 171 et l'acide aminé 383) relativement bien conservé correspondant à la zone d'interaction avec les protéines P et L. Chez la plupart des *Paramyxoviridae*, la protéine N comporte une séquence invariante d'une espèce à l'autre F-X₄-Y-P-X₃-S-Y-A-M-G [27]. On retrouve aussi cette séquence chez les *Henipavirus* mais la seconde tyrosine est remplacée par une phénylalanine [28].

La phosphoprotéine P est une protéine de 709 acides aminés pour une masse moléculaire théorique de 78 kDa. Elle joue un rôle important dans la stabilisation de la nucléocapside et peut interférer avec la réponse immunitaire innée quand elle se retrouve sous forme libre dans le cytoplasme [29]. Par comparaison avec les autres virus de la famille des *Paramyxoviridae*, la protéine P des *Henipavirus* est plus longue de 100 acides aminés [28].

La protéine de matrice M a une taille de 352 acides aminés et une masse moléculaire calculée d'environ 40 kDa. Elle joue un rôle structural dans l'architecture des virions mais aussi dans leur assemblage, leur bourgeonnement et leur entrée dans les cellules cibles [30]. La protéine M des *Henipavirus* est relativement similaire à celle des autres *Paramyxoviridae* [28].

La protéine de fusion F compte 546 acides aminés et a une masse moléculaire d'environ 60 kDa. Comme pour l'ensemble des *Paramyxoviridae*, cette protéine est une protéine de fusion de classe I et possède donc deux hélices α , impliquées dans la formation d'une structure trimérique en épingle à cheveux qui se transforme en long faisceau torsadé au cours de la fusion. Cette protéine est aussi une protéine membranaire de type I avec un domaine C-terminal cytoplasmique et un domaine N-terminal extracellulaire. Elle est d'abord produite sous la forme d'un précurseur FO, qui sera ensuite mûri par clivage en F1/F2 sous l'action de la Cathepsine L [31]. Chez les autres *Paramyxoviridae*, c'est généralement sous l'action Ca^{2+} dépendante de la furine que la protéine F est clivée. Lors de l'interaction de la protéine G avec son récepteur cellulaire et selon un mécanisme pH indépendant, la protéine F subit des modifications structurales à l'origine de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible conduisant à l'infection de la cellule et à la formation des syncytia [21].

La glycoprotéine G est une protéine de 604 acides aminés d'un poids moléculaire théorique de 67 kDa. C'est la protéine d'attachement du virus. Il s'agit d'une protéine membranaire de classe II (glycoprotéine transmembranaire avec un domaine N-terminal cytoplasmique) qui présente la particularité de n'avoir ni de fonction neuraminidase, ni d'activité hémagglutinine à l'inverse de celle d'un grand nombre de *Paramyxoviridae*. La protéine G du virus Nipah interagit via sa tête globulaire avec les protéines cellulaires Ephrine B2 [32] et Ephrine B3 [33] qui sont principalement exprimées à la surface des cellules endothéliales et des neurones.

Enfin, la protéine L (large) est la plus grosse protéine du virus Nipah avec 2244 acides aminés soit un poids moléculaire de 257 kDa. Il s'agit d'une ARN polymérase ARN dépendante très similaire à celle des autres *Paramyxoviridae*, excepté la substitution d'un acide aminé dans le motif catalytique très conservé de l'enzyme (GDNQ) qui devient GDNE [20]. Elle convertit l'ARN génomique viral (de polarité négative) en ARN messagers coiffés ou

en ARN antigénomiques (de polarité positive) qui serviront de matrice à la formation des nouveaux ARN génomiques. Elle est embarquée à l'intérieur des virions grâce à sa forte affinité pour les protéines N et P.

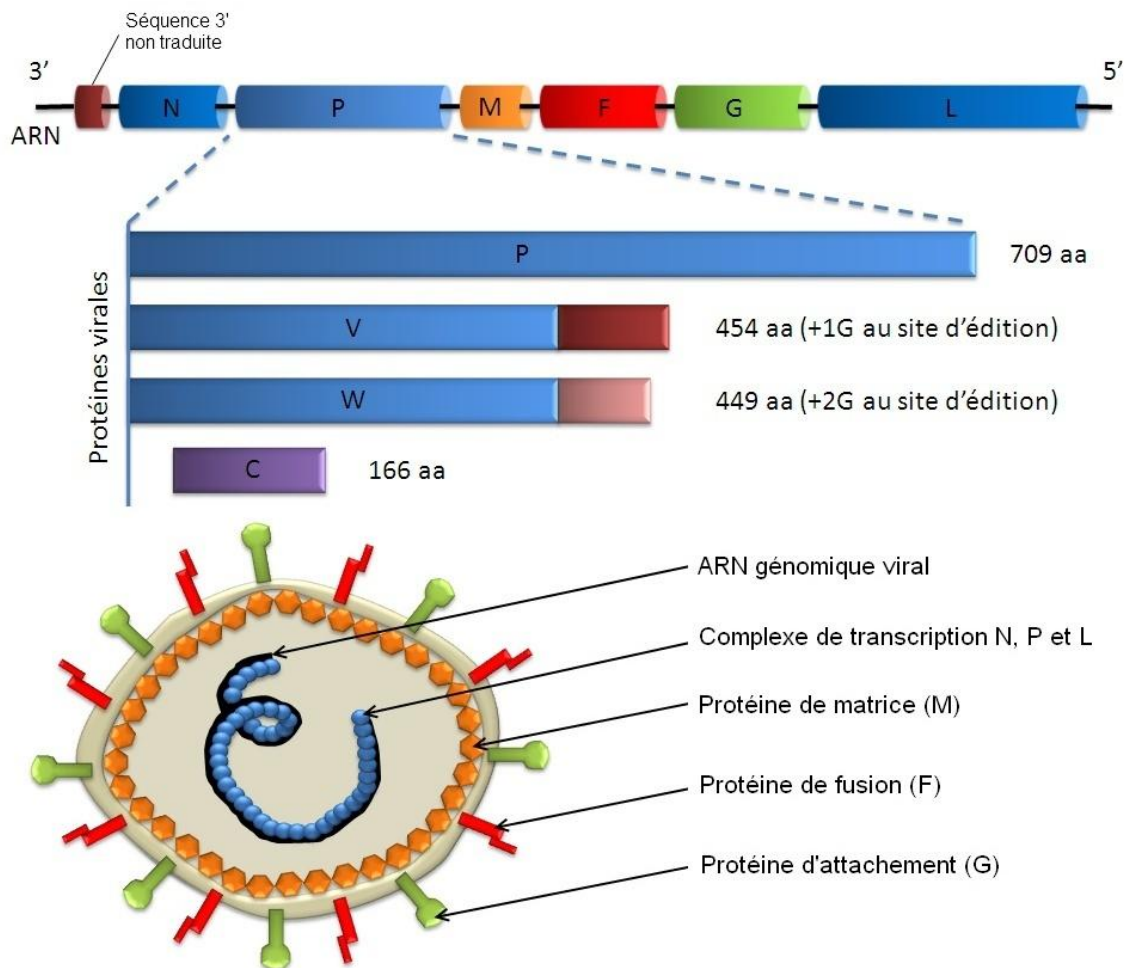


Figure 5 : Organisation génomique du virus Nipah et structure des virions.

b. Les protéines non-structurales

Le gène *p* est capable de coder 3 protéines non-structurales V, W et C (cf. Figure 5). La protéine non structurale C (166 acides aminés) est traduite à partir d'un nouveau codon AUG en aval de celui de P et d'un cadre de lecture différent (+2 nucléotides). Son rôle n'est pas encore clairement identifié chez le virus Nipah, bien que l'on soupçonne son implication dans les mécanismes viraux d'échappement à la réponse immunitaire innée [34,35]. Chez les autres *Paramyxoviridae*, le rôle de la protéine C est un peu mieux connu. On sait, par exemple que la protéine C du virus de la rougeole possède au moins deux rôles facilitant la multiplication virale. D'une part, elle est capable de lever l'inhibition du cycle cellulaire induite par l'entrée du virus dans la cellule par dérégulation de la production de IRF1 [36] et

d'autre part, elle inhibe les réponses interférons en empêchant la dimérisation de STAT1 et en altérant la voie d'induction par la PKR [36,37].

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

Lors d'une infection virale, de nombreux mécanismes de défense sont mis en jeu par la cellule hôte pour inhiber la multiplication virale. La réponse interféron constitue l'un des éléments majeurs de cette défense innée. Elle fait intervenir de nombreuses protéines, activées en cascades, et conduit à la synthèse d'interféron et de protéines antivirales. Cette réponse a lieu en deux temps. Tout d'abord, la présence du virus est détectée via des récepteurs membranaires, les Toll-like-receptors (TLR), ou cytosoliques (MDA5 et RIG-I). Cette détection conduit à l'activation de plusieurs facteurs dont IRF-3 qui est exporté dans le noyau où il active la synthèse de l'interféron (cf. Figure 6 A). L'interféron ainsi produit est libéré par la cellule dans le milieu extracellulaire. Il active alors les récepteurs IFNAR des cellules environnantes qui vont, à leur tour, entraîner la dimérisation des facteurs STAT1 et STAT2. Ce dimère est ensuite exporté dans le noyau de la cellule où il active les ISG (*Interferon Stimulated Genes*). Ces gènes conduisent enfin à la synthèse de protéines antivirales qui vont protéger la cellule contre une infection virale (cf. Figure 6 B).

Les protéines P, V et W des *Paramyxoviridae* participent à l'échappement immunitaire viral en inhibant la synthèse de l'interféron (cf. Figure 6 A) et son action (cf. Figure 6 B). L'action de la protéine V du virus Nipah sur la détection de l'ARN viral double brin par MDA5 est identique à celle des protéines V des autres *Paramyxoviridae* [21]. Les protéines non-structurales P, V et W du virus Nipah utilisent néanmoins des mécanismes tout à fait originaux. La protéine W du virus Nipah agit à l'intérieur du noyau, en fin de cascade, et permet donc d'abolir à la fois la voie MDA5 et la voie des TLRs [38] (cf. Figure 6 A). La protéine V des *Paramyxoviridae* joue un rôle dans l'inactivation des dimères de STAT1/STAT2. Contrairement à la protéine V du virus parainfluenza humain de type 2, du virus des oreillons et du virus Sendai qui inactivent ces dimères en les détournant vers le protéasome où ils sont détruits [21], les protéines P et V du virus Nipah ne conduisent pas à

la destruction des dimères mais à leur séquestration en complexes de haut poids moléculaire, parfaitement inefficaces [29]. La protéine W est aussi capable de séquestrer les dimères dans le noyau [39] (cf. Figure 6 B).

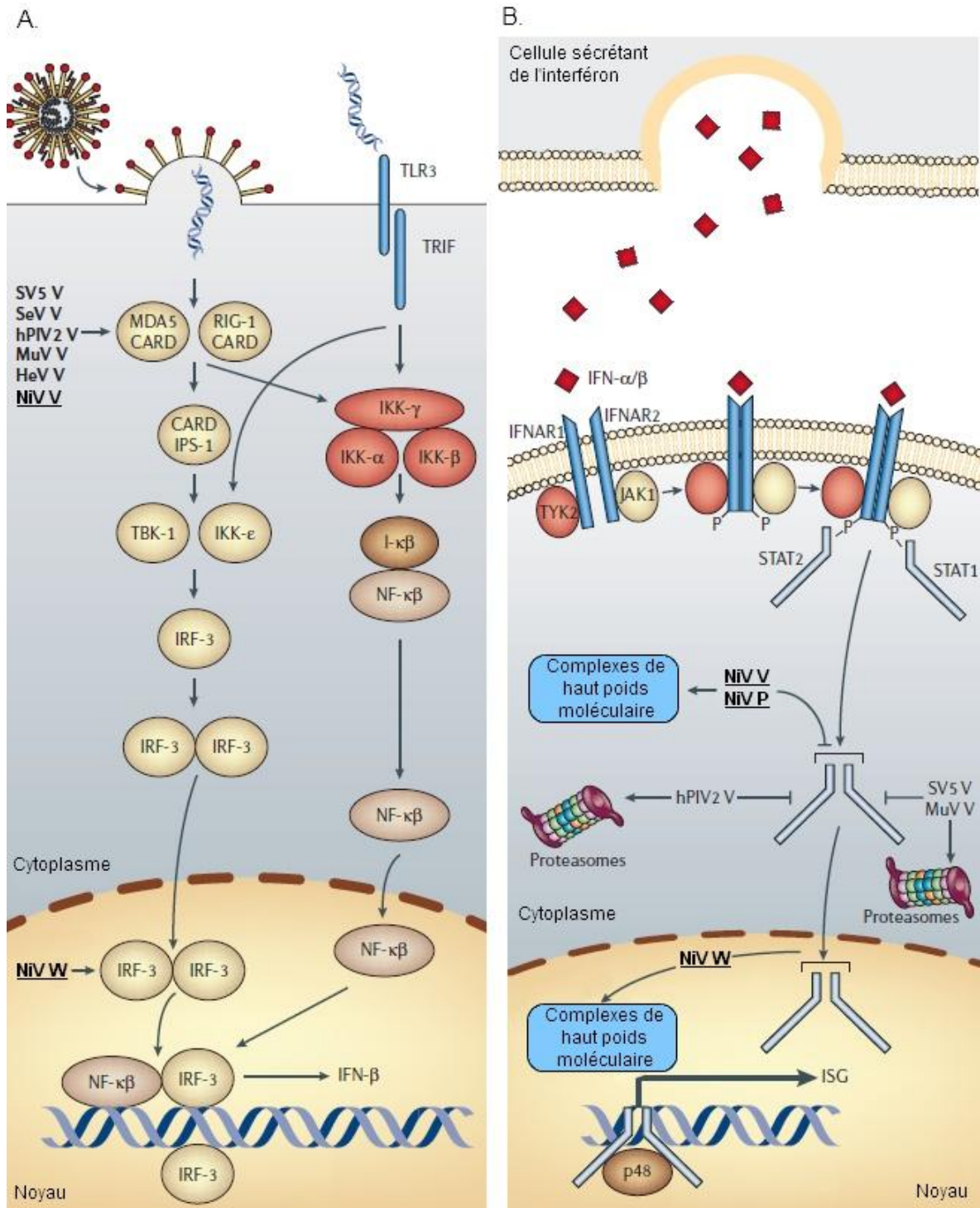


Figure 6 : Voies d'inhibition de la réponse interféron par les protéines non structurales des Paramyxoviridae. Adapté de [21].

3. Le cycle de réplication virale

L'entrée du virus dans la cellule constitue la première étape du cycle de réplication. Elle est déclenchée par l'interaction entre le récepteur cellulaire Ephrine B2 ou B3 et la protéine virale G. Cette interaction est à l'origine d'une modification conformationnelle qui libère la protéine F et permet la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale [40].

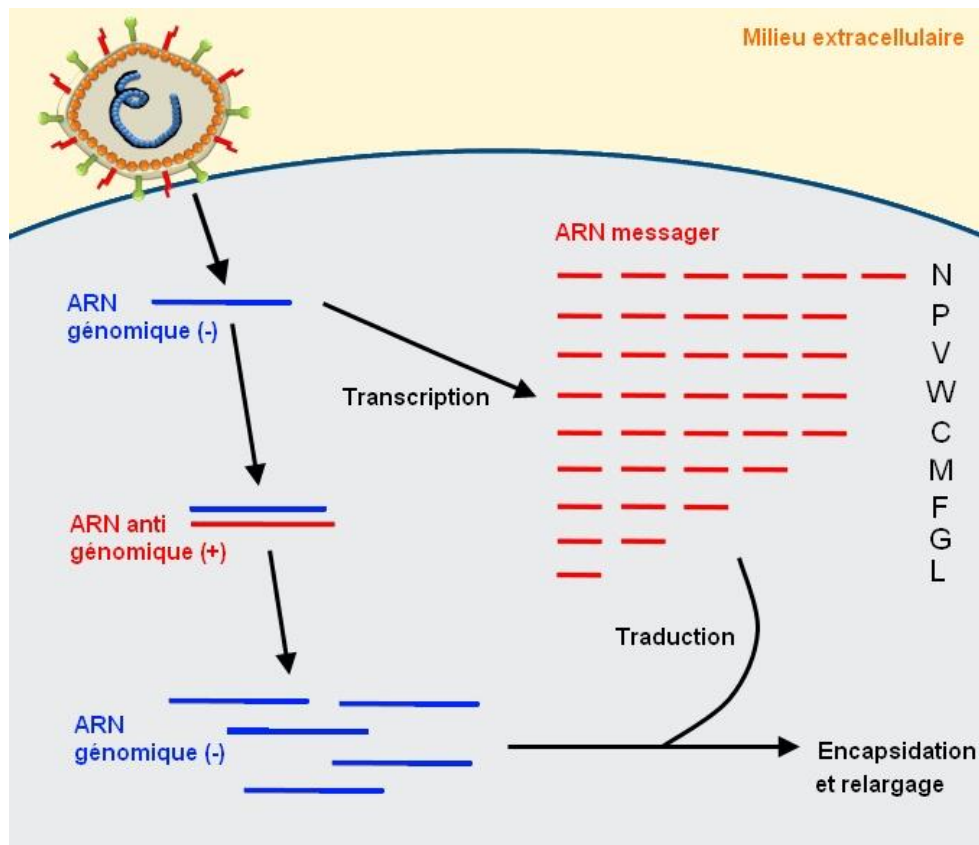


Figure 7 : Mécanique répllicative du virus Nipah.

Le virus Nipah est un virus de l'ordre des *Mononegavirales*. Il s'agit donc d'un virus à ARN simple brin de polarité négative. Ainsi, une fois entré dans la cellule, la première étape pour le virus est d'entamer sa réplication. Le virion possède une ARN-polymérase ARN-dépendante (protéine L) qui se met en marche à l'entrée du virus dans la cellule. Les ARN messagers (ARNm) sont produits selon un gradient résultant d'un phénomène d'atténuation polaire (cf. Figure 7). Ainsi, l'ARN-polymérase commence systématiquement par transcrire l'ARN génomique à partir du premier gène (N) et s'arrête à la première séquence intergénique. La polymérase peut alors se décrocher et se raccrocher à la séquence 3' non traduite ou continuer la transcription du gène suivant. La polymérase s'arrête à la séquence

intergénétique suivante où les mêmes options se présentent à nouveau. On retrouve ce mécanisme d'atténuation polaire chez l'ensemble des *Mononegavirales* [27]. Les séquences non traduites en 3' et en 5' fonctionnent respectivement en tant que promoteurs de la transcription et de la réplication de l'ARN génomique. Elles permettent la régulation de la synthèse des différents composants des virions.

D. Pathogénie

1. Voies d'entrée et dissémination du virus

L'entrée naturelle du virus dans l'organisme se fait majoritairement par voie aérienne mais est aussi possible par voie orale lors de la consommation de sirop de palme contaminé.

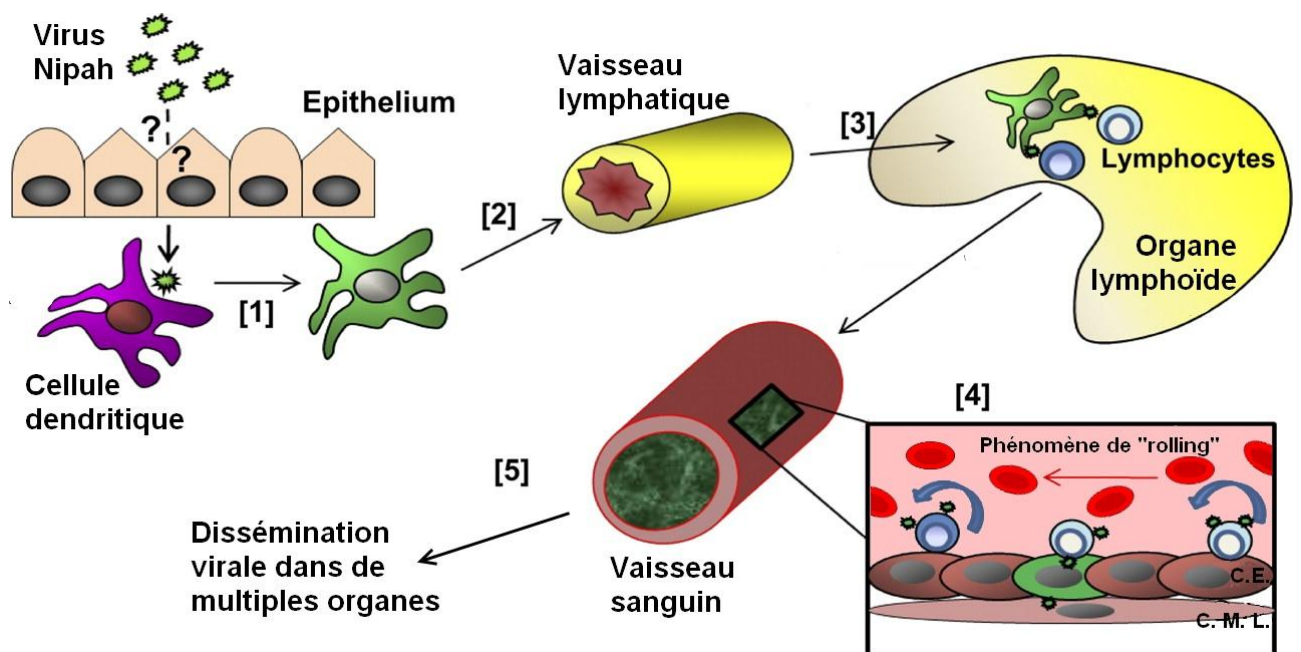


Figure 8 : Modèle de dissémination du virus Nipah utilisant les leucocytes. Légende : C.E. – Cellule endothéliale ; C. M. L. – Cellule musculaire lisse. Adapté de [41].

Selon un modèle développé récemment [41] (cf. Figure 8), l'infection commencerait dans les cellules dendritiques de l'épithélium respiratoire ou digestif qui constitueraient le site primaire de réplication (1). Les cellules dendritiques infectées migreraient alors vers les organes lymphoïdes drainants par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques (2). Les cellules endothéliales de ces vaisseaux peuvent être infectées à ce moment. Une fois arrivées dans les organes lymphoïdes, les cellules dendritiques infectées produisent des particules infectieuses de virus Nipah qui peuvent s'adsorber sur les nombreux lymphocytes environnants (3). Cette adsorption permettrait au virus d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire et une dissémination rapide dans tout l'organisme via le flux sanguin.

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

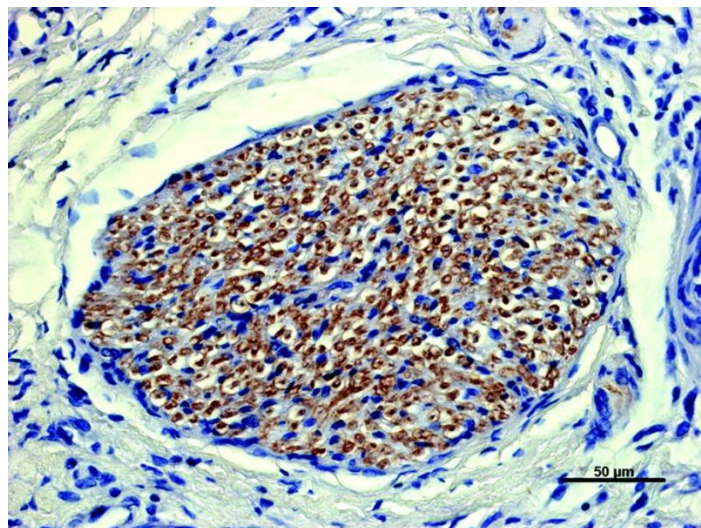


Figure 9 : Immunomarquage positif des antigènes du virus Nipah dans les axones du nerf olfactif. Coupe transversale des cornets nasaux. Tiré de [42].

Néanmoins, l'infection du parenchyme cérébral semble aussi possible par remontée axonale. Ce mode de dissémination a été mis en évidence chez le porc, dans les axones du nerf olfactif (cf. Figure 9), lors d'études *in vivo* d'infections simultanées par voie intranasale, orale et oculaire [42].

2. Cellules cibles et récepteurs d'entrée

Les principales cellules touchées par le virus sont les cellules endothéliales et les neurones. Néanmoins, un très grand nombre de types cellulaires peut être infecté par le

virus Nipah. Ce très large tropisme semble lié à la distribution du récepteur viral : les molécules Ephrine B2 et B3.

La molécule EphrineB2 a été identifiée en 2005 comme étant le récepteur nécessaire à l'entrée du virus dans les cellules cibles [32]. Cette protéine transmembranaire de 333 acides aminés, appartenant à la famille des Récepteurs Tyrosine Kinase, permet la transmission bidirectionnelle de signaux. Elle agit donc aussi bien en tant que récepteur ou en tant que ligand. Elle est largement exprimée à la surface de l'endothélium et des cellules neuronales et joue un rôle majeur lors du développement embryonnaire précoce en intervenant dans les étapes de neurogénèse [43] et d'angiogénèse [44]. Elle interagit aussi avec le système immunitaire au moment de la diapédèse monocyttaire. Ephrine B4, le ligand d'Ephrine B2, est exprimé à la surface des monocytes. L'interaction entre cette molécule et la partie extracellulaire d'Ephrine B2 permet l'attachement des monocytes à la paroi de l'endothélium. La migration à travers l'endothélium est ensuite assurée par la portion intracellulaire d'Ephrine B2 [45]. L'Ephrine B2 est une molécule extrêmement conservée au cours de l'évolution, particulièrement dans sa zone d'interaction appelée boucle G-H [46]. On la retrouve chez l'ensemble des mammifères et même chez les oiseaux et les poissons. Son expression concerne l'ensemble des grands appareils physiologiques et intervient, à différentes intensités, dans plus de 50 types cellulaires [47].

L'Ephrine B3, une protéine très exprimée dans les cellules du cerveau et ayant une forte homologie avec l'Ephrine B2, peut aussi constituer un récepteur pour le virus Nipah mais avec une affinité bien moindre [33].

II. Epidémiologie

A. Espèces cibles

1. Les chauves-souris

Les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* sont identifiées depuis 1996 comme réservoir du virus Hendra [48]. En effet, étant donné la forte ressemblance entre le virus Hendra et le virus Nipah, l'hypothèse d'un réservoir chauve-souris a rapidement été envisagée [49]. L'implication des chauves-souris frugivores en tant que réservoir sauvage du virus Nipah a été clairement démontrée en 2001 [50]. Mieux encore, le caractère saisonnier

du virus Nipah a pu être corrélé au niveau d'excrétion du virus par les chauves-souris [51] et semble aussi être lié à leur période de reproduction. Les études de séroprévalence conduites auprès des différentes espèces de chauves-souris frugivores d'Asie du Sud-est ont permis d'identifier les espèces suivantes comme réservoirs du virus Nipah (cf. Tableau 1).

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

Espèce	Séroprévalence
<i>Pteropus giganteus</i>	63 % [52]
<i>Pteropus hypomelanus</i>	31 % [50]
<i>Pteropus vampyrus</i>	17 % [50]
<i>Pteropus lylei</i>	10,9 % [53]
<i>Eonycteris spelaea</i>	5 % [50]
<i>Cynopterus brachyotis</i>	4 % [50]

Récemment, l'étude de l'émergence du virus Nipah à partir du réservoir chauve-souris a fait l'objet d'études originales basées sur une approche sociale et environnementale. Les chercheurs du Groupe de Recherche sur l'Ecologie des *Henipavirus* (HERG) ont pu mettre en évidence le caractère décisif de différents facteurs conduisant à l'émergence du virus. Parmi ces facteurs, l'intensification agricole a joué un rôle majeur. En effet, l'augmentation des terres agricoles au détriment de l'habitat naturel des chauves-souris ainsi que la double utilisation de ces terres, à la fois pour la culture d'arbres fruitiers et l'élevage, ont produit un contexte favorable au franchissement de la barrière d'espèce et à l'émergence du virus Nipah [54]. Ce type d'études interdisciplinaires apporte une information de grande valeur et permet une ouverture d'esprit essentielle à l'avancée des connaissances scientifiques sur le virus.

Les études en laboratoire apparaissent néanmoins comme indispensables pour une compréhension fine de la pathologie associée à l'infection par le virus Nipah. Bien qu'elle héberge le virus, la chauve-souris ne semble présenter aucun signe clinique associé à l'infection. Cette infection subclinique est cependant caractérisée par la présence transitoire de virus dans certains viscères (notamment reins et utérus), une excrétion transitoire de virus (urine) et une séroconversion [55].



Figure 10 : Colonie de Pteropus giganteus au Sri-Lanka. Photo de Bernard Gagnon.

Les modifications histologiques associées à l'infection ciblent particulièrement les organes du tractus urinaire (néphrite interstitielle, œdème vésical, pétéchies sur la paroi vésicale) et le foie (hépatite). L'excrétion urinaire du virus est possible même après séroconversion et semble être à l'origine d'une transmission horizontale suffisante pour maintenir le virus. Les colonies de chauves-souris contiennent des milliers d'individus et l'air environnant est rempli de microgouttelettes d'urine en suspension aérosol (cf. Figure 10). La pratique de la toilette mutuelle, particulièrement au moment de la parturition, et l'utilisation de l'urine en tant que liquide d'aide au nettoyage [56] facilite les infections par contact direct. Une transmission verticale ou pseudo-verticale est aussi envisagée et cohérente avec les périodes d'épidémie. Par ailleurs, des études montrent la présence du virus Hendra dans des tissus placentaires et des fœtus issus de chauves-souris infectées [23,57]. Un raisonnement par analogie sur le virus Nipah semble relativement cohérent.

2. Les porcs

Le porc a été le premier animal identifié comme étant à l'origine des cas humains d'infection par le virus Nipah [7]. Les premières enquêtes épidémiologiques menées en Malaisie et à Singapour ont permis de mettre en évidence une diffusion extrêmement rapide du virus au sein des cheptels par voie aérosol (confirmée par la suite en laboratoire [58]) avec une morbidité proche de 100 % et un grand nombre d'infections asymptomatiques [12]. La létalité est en revanche assez faible, de l'ordre de 1 à 5 %. Les signes cliniques sont

majoritairement respiratoires avec une toux marquée faisant penser à un aboiement, parfois accompagnée de troubles neurologiques conduisant à une mort subite. Les études histologiques mettent principalement en évidence des anomalies pulmonaires incluant pneumonie interstitielle, hémorragies, formation de syncytia parmi les cellules endothéliales des vaisseaux pulmonaires et vascularite généralisée. L'immunohistochimie permet d'identifier le virus en grande quantité dans les épithéliums pulmonaires [9]. Ceci suggère une excrétion nasale, en parfaite cohérence avec l'implication majeure d'une contamination aérosol démontrée expérimentalement.

L'infection initiale des porcs s'est vraisemblablement produite par contact aérosol avec de l'urine ou des fèces de chauves-souris infectées [59]. La voie de contamination orale par les fèces ou par l'ingestion de chauves-souris mortes semble possible bien que moins efficace [58]. Les densités de populations porcines sont extrêmement élevées dans ces régions et l'épizootie s'est propagée rapidement de ferme en ferme par le transport et l'échange d'animaux vivants (notamment pour les saillies) ainsi que la réutilisation de seringues lors des campagnes de vaccination [9].

3. Les hommes

Ce sont les cas humains qui ont fait prendre conscience de l'émergence du virus Nipah. La morbidité est relativement faible et lors de la plus grosse épidémie, en 1998-1999 en Malaisie, seulement 265 cas ont été rapportés dont 105 décès [13]. Lors de cette épidémie, le taux de létalité immédiat varie entre 32 % [60] et 41 % [61]. Le taux de rechute est estimé à 7,5 % et le taux d'apparition retardée à 3,4 % [62]. On note que 15 % [60] à 19 % [61] des patients ayant survécus présentent des séquelles neurologiques. Le taux de survie à long terme et sans séquelle est donc situé autour de 40 %.

Au Bangladesh et en Inde, les données épidémiologiques sont un peu différentes avec un taux de létalité beaucoup plus élevé, autour de 73 % (variant entre 33 % et 100 % selon les épidémies) [63]. La seconde différence principale entre les souches est aussi liée au type de patients infectés. En Malaisie, les patients sont des adultes mâles, en apparence bonne santé [60], alors qu'au Bangladesh et en Inde, les patients sont principalement des jeunes enfants ou des personnes âgées [64]. Les épidémies sont récurrentes depuis 2001, mais ne touchent qu'un faible nombre de personnes chaque année. On recense un peu plus de 200 personnes atteintes en 10 ans, avec un total de 146 morts à l'été 2011. La proportion

de patients présentant des séquelles neurologiques n'est pas significativement différente de celle observée en Malaisie [65].

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

4. Les animaux domestiques

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

Les chiens ne s'avèrent cependant pas très sensibles à l'infection et on ne recense qu'un très faible nombre de cas de séroconversion (4 animaux positifs sur les 249 testés à travers le pays [66] bien qu'une autre étude avec un échantillonnage réalisé aux environs des fermes infectées renvoie 42 échantillons positifs sur les 92 testés [50]). L'immunohistochimie a permis de mettre en évidence l'infection de deux chiens retrouvés moribonds aux alentours des fermes infectées. Ces chiens présentaient des signes cliniques et des lésions relativement similaires à ceux de la maladie de Carré incluant fièvre et détresse respiratoire associées à un œdème pulmonaire, une pneumonie interstitielle, une méningite non-suppurée et de nombreuses pétéchies [67].

Les chats peuvent aussi être infectés [9] bien que l'évènement soit très rare dans la nature [68] (un seul cas naturel recensé). Expérimentalement, le chat est un bon modèle pour les symptômes respiratoires [58,69] liés à l'infection par le virus Nipah. Les lésions recensées incluent des pétéchies sur la plèvre viscérale, une bronchiolite et une alvéolite aiguë, un œdème inflammatoire de la séreuse vésicale et de nombreuses hémorragies diffuses. Le virus a pu être mis en évidence dans la plupart de ces tissus par immunohistochimie et RT-qPCR [69]. La transmission verticale et la réplication virale chez le fœtus ont été démontrées avec un niveau de réplication fœtal similaire à celui observé chez l'adulte [70]. Cette découverte fait du chat un excellent modèle pour étudier la transmission verticale susceptible d'avoir lieu chez la chauve-souris.

Parmi les herbivores, on ne recense qu'un seul cas équin confirmé par immunohistochimie. Seul le système nerveux central était atteint et présentait des lésions

de méningite non-suppurative associées à une infiltration leucocytaire du parenchyme cérébral, particulièrement en périphérie des vaisseaux sanguins [67]. Des études sérologiques ont aussi permis de mettre en évidence l'infection de deux poneys hébergés dans la zone d'épidémie malaisienne [71]. Les études sérologiques doivent cependant être considérées avec circonspection car elles peuvent donner des résultats faux-positifs. Le cas s'est d'ailleurs produit en mai 2011 où 4 chevaux de course ont été bloqués à Singapour pendant plusieurs semaines avant confirmation du résultat faux-positif par séroneutralisation [72]. Les chèvres semblent aussi susceptibles à l'infection par le virus Nipah [9,73], bien qu'aucune donnée immunohistochimique ou sérologique ne soit disponible pour confirmer ce fait. Aucun cas bovin n'a été recensé bien que le contact avec des bovins malades soit identifié dans une étude comme facteur de risque statistiquement significatif [15].

Les rongeurs sont la source de nombreuses zoonoses virales et bactériennes. Leur rôle dans la diffusion du virus Nipah a donc très rapidement été envisagé. Néanmoins, toutes les études réalisées sur les rongeurs situés à proximité des zones d'infection sont formelles : les rongeurs locaux (souris, rats, musaraignes, ...) ne sont pas susceptibles à l'infection par le virus Nipah [15,50].

5. Les modèles animaux expérimentaux

Le recours à des modèles animaux expérimentaux pour étudier la physiopathologie de l'infection par le virus Nipah est indispensable. L'utilisation de ces modèles animaux doit aussi être compatible avec le travail et les infrastructures de niveau P4. A l'heure actuelle, seul le CSIRO (Australie) possède un laboratoire suffisamment grand pour étudier des cohortes de chevaux, porcs ou chauves-souris. Le développement de modèles de plus petite taille constitue donc un enjeu majeur de la recherche sur le virus Nipah. La pathologie associée à chacun de ces modèles animaux sera détaillée ultérieurement (cf. Partie II.1)

Le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) a été le premier modèle animal de petite taille validé pour les études de pathologie [4]. Il développe des signes cliniques neurologiques et systémiques. Il est extrêmement sensible à l'infection et les lésions observées ressemblent à celles observées chez l'homme (encéphalite, vascularite, hémorragies, infiltrations leucocytaires, ...).

Le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) est un modèle alternatif au hamster doré. Cependant, il est beaucoup moins sensible et les signes cliniques sont essentiellement neurologiques. Il ne constitue donc pas un très bon modèle d'étude pour le virus Nipah [74]. Les lésions observées sont en revanche assez claires et ont fait l'objet d'une étude assez développée [75]. Une transmission verticale pour le virus Hendra a été démontrée chez cette espèce [57] mais n'a jamais été étudiée avec le virus Nipah.

Le furet (*Mustela putorius furo*) est un modèle animal largement utilisé pour les infections respiratoires et constitue l'un des meilleurs modèles d'étude pour le virus influenza. L'infection par le virus Nipah est possible par voie nasale et se révèle très performante, mimant ainsi assez bien une infection naturelle. Les signes cliniques sont principalement respiratoires mais certains individus développent des signes neurologiques. Les lésions observées sont principalement de type hémorragique (pétéchies sur le parenchyme pulmonaire, les reins et la cavité abdominale, hémorragies sous-cutanées diffuses) et systémique (vascularite, œdème). L'organe le plus sévèrement touché est le poumon où l'on observe une alvéolite nécrotique importante associée à une très forte inflammation [76].

De façon anecdotique, l'embryon de poulet a été utilisé pour caractériser les effets physiopathologiques de l'infection par le virus Nipah [77]. Ce modèle a permis de confirmer le tropisme endothélial du virus et les organes touchés, à savoir le cœur, le cerveau, les reins, la rate et certains épithéliums. Néanmoins, il n'apporte pas vraiment d'informations nouvelles et originales.

En 2010, deux modèles primates non humains ont été développés en parallèle ; l'un sur le singe vert africain ou grivet (*Chlorocebus aethiops*) [1,2] et l'autre sur le saïmiri (*Saimiri sciureus*) [3]. Il s'agit pour l'instant des meilleurs modèles animaux existant pour l'étude de la physiopathologie du virus Nipah, mais leur utilisation doit être strictement justifiée et réduite à son minimum. L'emploi de ce modèle sera donc particulièrement envisagé pour les études finales d'efficacité de potentiels traitements prophylactiques et thérapeutiques. Les voies d'infection, les symptômes, leur durée et le taux de survie sont cohérents avec ceux observés chez l'homme. Ces études ont ainsi démontré la possibilité d'infection par voie orale [2]. Les lésions observées sont principalement de type hémorragique dans les poumons, les méninges et le cerveau. Le virus et des formations syncytiales endothéliales

peuvent être mis en évidence dans une très large majorité des organes incluant la langue, les glandes salivaires, le larynx, la trachée, le cœur, la vésicule biliaire, les reins, les organes sexuels, les glandes adrénales et pituitaires, l'estomac, l'intestin grêle, le colon, les muscles squelettiques, les méninges, le cerveau et la moelle épinière.

B. Aire de répartition géographique

Les chauves-souris frugivores de la famille des *Pteropodidae* couvrent une très large surface du globe incluant l'Asie du Sud-est, l'Océanie, l'Afrique sub-saharienne et, de façon anecdotique, l'île de Chypre (source OMS). En tant que réservoir sauvage et sachant que ces chauves-souris sont capables de couvrir de très longues distances [59], l'étude de la séroprévalence du virus Nipah chez ces animaux, sur l'ensemble de leur aire de répartition, constitue un enjeu majeur de détection précoce d'un potentiel événement épidémique.

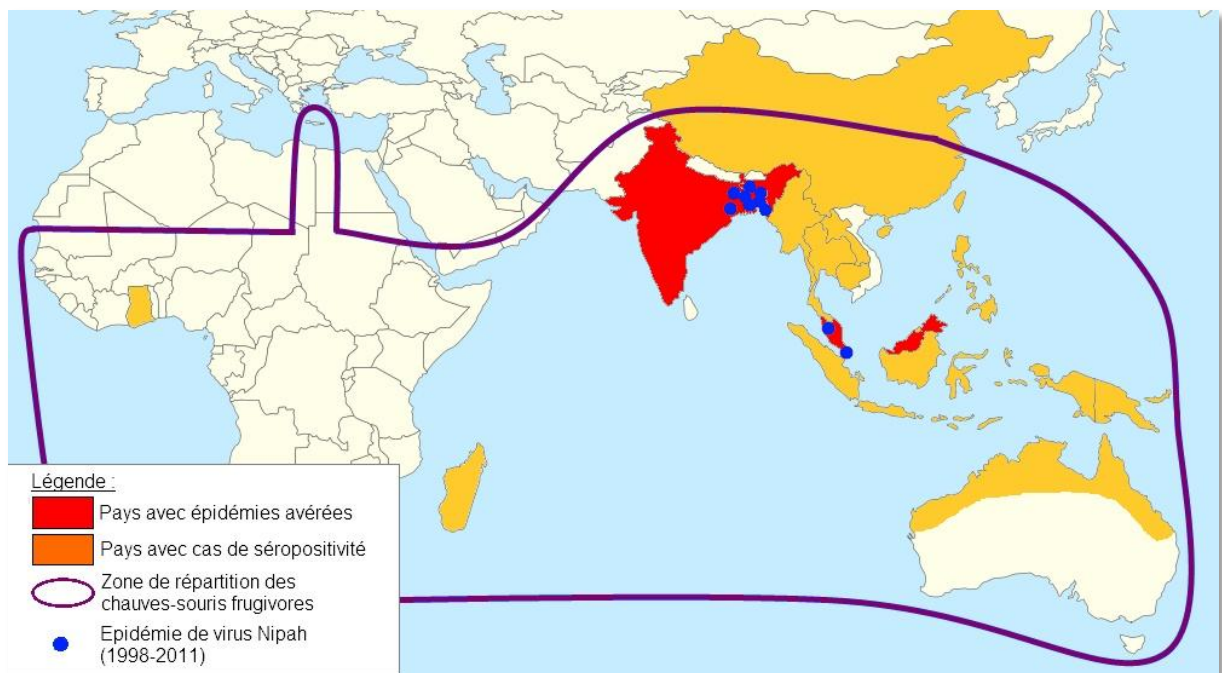


Figure 11 : Répartition géographique des épidémies de virus Nipah et des chauves-souris frugivores de la famille des *Pteropodidae*.

En 2007 et 2008, des études ont montré l'existence de chauves-souris séropositives pour le virus Nipah en Afrique de l'Ouest, au Ghana [78] et à Madagascar [79] (cf Figure 11). Il s'agit d'une autre espèce de chauve-souris frugivore du genre *Eidolon* : *Eidolon helvum* et *Eidolon dupreanum*. Ces découvertes étendent la zone d'endémicité potentielle du virus Nipah même si aucun cas humain n'a été recensé à ce jour en Afrique.

C. Transmission à l'homme

1. Transmission aérosol

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

2. Transmission porcine

La transmission des chauves-souris aux porcs semble se faire par voie oronasale, bien que la voie orale semble moins efficace que la voie nasale [58]. Les deux modes de contamination envisagés incluent : d'une part, le contact direct de la muqueuse respiratoire avec des gouttelettes d'urine infectée, en suspension ou par fouissage ; d'autre part l'ingestion de fruits contaminés par de la salive et tombés à terre ou l'ingestion de cadavres de chauves-souris. La première hypothèse semble la plus probable. La transmission entre porcs se fait très certainement uniquement par voie nasale, via les excréments oropharyngées [58]. Cette transmission est renforcée par le comportement social du porc et la forte toux provoquée par l'infection.

La transmission du porc à l'homme se fait exclusivement par voie aérosol et par contact direct avec les fluides respiratoires. Les premiers cas identifiés en Malaisie portent à 93 % sur des éleveurs de porcs ou leur famille [60] qui se sont infectés en passant dans les porcheries d'animaux touseurs. Les cas singapouriens concernent uniquement des travailleurs d'abattoirs exposés, ante ou post-mortem, aux fluides respiratoires et à l'urine de porcs malaisiens malades [11,80]. Des résultats similaires sont obtenus dans une enquête auprès d'abattoirs malaisiens [81] ou auprès du personnel militaire employé pour l'abattage massif en Malaisie [82]. Ces deux études confirment la nécessité d'un contact proche entre l'homme et l'animal pour une infection productive.

3. Transmission interhumaine

Si la transmission interhumaine est suspectée dès l'épidémie bangladaise de 2001 [83] puis à nouveau en 2004 [84], son existence est formellement acceptée en 2007 [85]. Les

études épidémiologiques des événements malaisiens n'avaient révélé aucun cas de transmission interhumaine. Nonobstant, il semble que, malgré sa proximité phylogénétique (cf. Partie I.IV.C), la souche bangladaise soit tout à fait différente sur ce point. Ce mode de transmission est renforcé par les normes sociales du Bangladesh qui imposent aux familles de prendre soin de leurs malades elles-mêmes. Les personnels hospitaliers sont d'ailleurs très réticents à s'occuper des soins quotidiens aux malades. Ce contexte augmente considérablement le risque de transmission aux familles, qui procurent des soins sans formation aux règles d'hygiène ni protection. Le caractère « divin » de la maladie intervient aussi beaucoup dans sa propagation. En effet, plusieurs familles ont fait appel à des guérisseurs spirituels et fakirs qui ont rapidement associés les épidémies de Nipah avec l'intervention de démons venus pour punir les villageois de leurs péchés. Les traitements proposés par leurs soins prennent généralement la forme de cérémonie avec massages à l'huile sacrée, application de pâtes à base de plantes et prières, où toute la famille voire le village est convié, favorisant la contamination par le malade [86]. Une chaîne de transmission de la maladie, faisant intervenir un dignitaire religieux local, est particulièrement bien décrite dans une étude sur l'épidémie de 2004 dans le district de Faridpur au Bangladesh [87].

4. Contamination alimentaire

Au Bangladesh et en Inde, l'absence du facteur porcin a fait suspecter l'existence d'autres voies d'infection. Les études épidémiologiques ont montré que « boire du sirop de palme » [88] et « grimper dans les arbres » [89] sont deux facteurs de risque clés de l'infection par le virus Nipah, multipliant environ par 8 le risque d'infection. Par ailleurs, toutes les épidémies ont eu lieu pendant la période de récolte du sirop de palme, de mi-octobre au début du mois d'avril [90]. Cette récolte est une activité agricole traditionnelle au Bangladesh. Les ouvriers qui saignent et collectent la sève de palmier (*Phoenix sylvestris*) sont appelés *gachhis*.

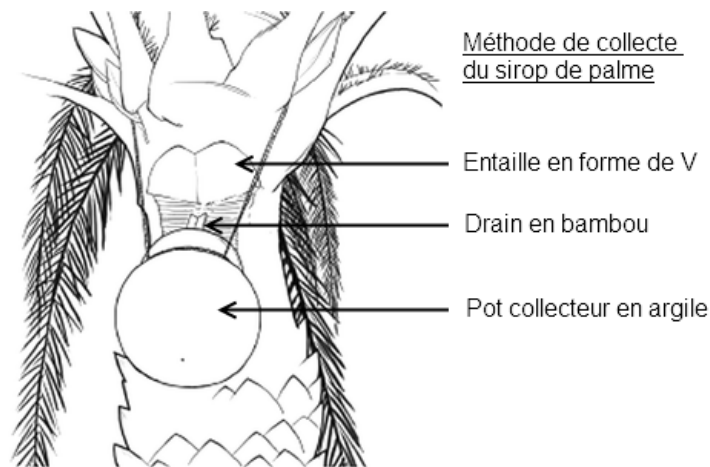


Figure 12 : Mode opératoire pour la collecte de sirop de palme. Adapté à partir de [90].

Ils récoltent le sirop de palme en effectuant sur le tronc une entaille en forme de « V » de 20 cm par 30 cm, sur une profondeur d'environ 2 cm, à la base des branches. La forme de l'entaille permet l'écoulement de la sève le long d'un drain en bambou qui mène à un pot collecteur en argile suspendu sous l'entaille (cf Figure 12).

Au Bangladesh, la sève de palmier est utilisée principalement sous deux formes : la plupart est transformée en mélasse et l'autre partie est consommée brute. Pendant l'hiver, les *gachhis* collectent le sirop de palme très tôt le matin ; le sirop brut est revendu quelques heures plus tard sur les marchés locaux et consommé immédiatement avant de fermenter et de perdre son goût sucré [90].

Une étude utilisant une caméra infrarouge [91] a permis de démontrer que les chauves-souris frugivores sont friandes du sirop de palme. Elles sont susceptibles de contaminer la sève par leur salive, leurs fèces et leur urine (cf. Figure 13).



Figure 13 : Chauves-souris surprises en train de lécher (flèche noire) et d'uriner (flèche blanche) dans la sève collectée [91]

Au Bangladesh, ce mode de contamination est responsable d'une large majorité de cas. Depuis mars 2011, la commercialisation du sirop de palme sous forme brute est d'ailleurs formellement interdite par décret gouvernemental pour tenter d'enrayer la recrudescence de cas humains.

III. Tableau clinique

A. Symptômes

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

L'infection des chauves-souris par le virus Nipah est subclinique et généralement indétectable dans le contexte naturel. Dans le contexte expérimental, on ne note pas non plus de signes cliniques, pas d'élévation de température ni de perte de poids [55].

2. Chez le porc

Les symptômes détectés chez le porc sont essentiellement de type respiratoire. Le terme de « syndrome du cochon aboyeur », en référence à la toux puissante associée à l'infection, a d'ailleurs été l'un des tous premiers termes techniques utilisés pour décrire la maladie. L'infection apparaît néanmoins comme asymptomatique dans la plupart des cas. Les signes cliniques diffèrent un peu selon l'âge auquel l'animal est infecté [9].

a. Porcelets avant sevrage (< 4 semaines)

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

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

Cette catégorie d'animaux présente généralement un syndrome fébrile aigu (> 39,9°C) avec des signes respiratoires allant d'une respiration rapide et laborieuse à une forte toux non productive sévère faisant penser à un aboiement de chien. Une hémoptysie peut être observée sur les cas sévères et une respiration bouche ouverte sur les cas un peu moins sévères. Parmi les signes neurologiques pouvant être observés, on recense des

tremblements et tics neurologiques, des myoclonies, une faiblesse du train arrière, un degré variable de parésie spastique, de la boiterie, une démarche incoordonnée et enfin, une douleur généralisée particulièrement localisée sur les quartiers arrières. Dans cette catégorie, la maladie peut être asymptomatique, modérée ou fulminante et amplifiée par le stress. La morbidité est proche de 100 % et la létalité de 1 à 5 %.

c. Truies et verrats reproducteurs

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

3. Chez l'homme

De très nombreuses études se sont attachées à décrire, chez l'homme, les signes cliniques liés à l'infection par le virus Nipah. La toute première étude, portant sur 94 patients, recense de façon exhaustive les signes cliniques identifiés lors de l'épidémie malaisienne de 1998-1999 [60]. Ces signes sont recensés dans le Tableau 2. Les signes neurologiques sont une caractéristique forte de la maladie et ceux-ci sont particulièrement augmentés lorsque le niveau de conscience est réduit.

Tableau 2 : Fréquence des signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah chez l'homme d'après [60].

Signes cliniques associés à l'infection par le virus Nipah		% de patients atteints (n=94)
Signes généraux	Fièvre	97
	Maux de tête	65
	Vertiges	36
	Vomissements	27
	Toux sèche	14
	Myalgie	12

Signes neurologiques	Diminution du niveau de conscience	55
	Signes neurologiques focaux	11
	Absence ou diminution des réflexes	56
	Pupille anormale	52
	Tachycardie (>120 bpm)	39
	Hypertension (>160/90 mmHg)	38
	Réflexe vestibulo-oculaire	38
	Myoclonie segmentaire	32
	Syndrome méningé	28
	Epilepsie	23
	Nystagmus	16
	Syndrome cérébelleux	9
	Ptose bilatérale	4
	Tremblement postural bilatéral	3
	Dysarthrie	3
	Dysphasie	2

Les fréquences ne sont néanmoins pas très fiables et ne donnent qu'une idée de la répartition des signes cliniques. Le plus intéressant en termes de recensement des signes cliniques concerne très certainement la comparaison entre les signes cliniques observés en Malaisie et au Bangladesh [63].

Le fait que la part respiratoire des signes cliniques soit un peu plus faible dans l'épidémie malaisienne de 1998-1999 (de 14 % [60] à 29 % [61]) constitue la principale différence clinique entre les épidémies de ces deux pays. Dans les épidémies du Bangladesh, on note l'apparition de toux (62 % des cas) et de difficultés respiratoires (69 % des cas) avec des radiographies pulmonaires montrant une opacité bilatérale qui couvre la majorité des poumons (cf. Figure 14).

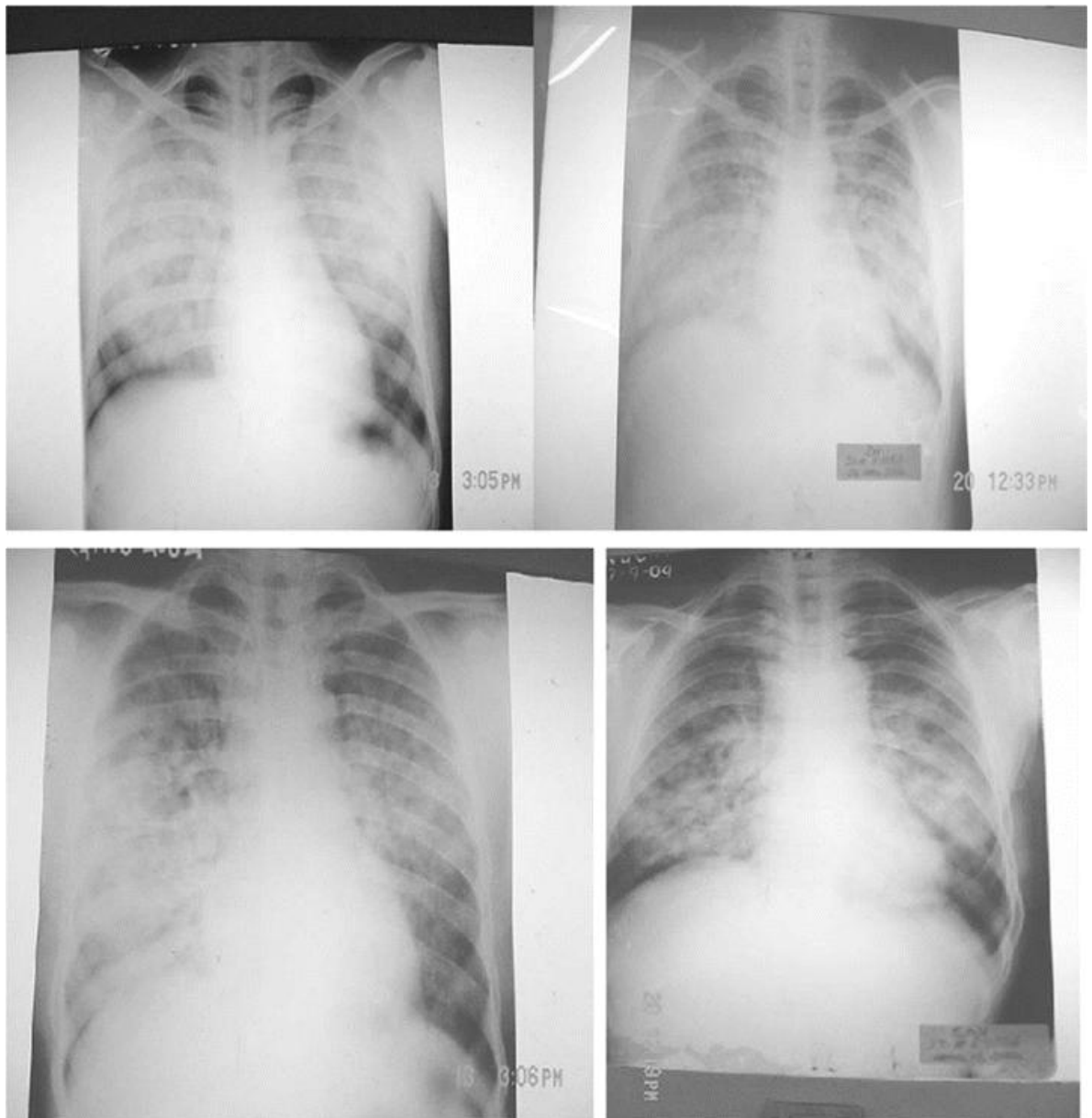


Figure 14 : Radiographies pulmonaires de 4 patients, montrant une opacité diffuse bilatérale couvrant la majorité des poumons, compatibles avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Issu de [64].

Dans l'épidémie de Siliguri, en Inde, les symptômes respiratoires sont rapportés dans 51 % des cas [83]. La prééminence du caractère respiratoire de la maladie liée à l'infection par la souche bangladaise constitue un des facteurs favorisant l'apparition d'une transmission interhumaine. La seconde différence majeure entre les deux zones géographiques est la présence de myoclonies segmentaires persistantes observées dans 32 % [60] à 54 % [61] des cas malaisiens qui n'est pas retrouvée au Bangladesh ; bien que l'hyporéflexie générale des patients malaisiens soit aussi présente chez les patients bangladais [64].

Les rechutes d'encéphalites apparaissant des mois voire des années après un premier épisode (associées une fièvre aiguë, des céphalées, convulsions et troubles neurologiques focaux) constituent une autre particularité de la maladie liée à l'infection par le virus Nipah. En Malaisie, une étude portant sur 24 mois de suivi annonce qu'environ 10% des patients ont été touchés par ces rechutes ou encéphalites tardives [92]. Au Bangladesh, une étude portant sur 22 cas observe les mêmes rechutes, avec un taux de 18 % (4 cas) [65]. Les signes cliniques associés à ces rechutes semblent particulièrement concerner les nerfs crâniens avec notamment une paralysie des muscles oculomoteurs, un nystagmus ou affaissement du visage.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les différences cliniques observables entre les épidémies ayant eu lieu en Malaisie et au Bangladesh. Tout d'abord, les différences génétiques entre les deux souches virales jouent très certainement un rôle dans l'expression et la virulence de la maladie. Ensuite, le Bangladesh et la Malaisie sont des pays avec un niveau de développement très différent. En effet, le Bangladesh compte parmi les pays les moins développés d'Asie, derrière le Pakistan, avec un Indice de Développement Humain (IDH) de 0,469 contre 0,744 pour la Malaisie (le maximum étant de 0,938 pour la Norvège). En d'autres termes, la Malaisie fait partie des 60 pays les plus développés du monde alors que le Bangladesh fait partie des 40 pays les moins développés du monde [93]. Ceci a pour conséquences directes des conditions de vie, d'hygiène et de nutrition bien moins favorables au Bangladesh ainsi qu'un accès aux soins bien plus limité qu'en Malaisie pouvant expliquer une mortalité plus élevée et une transmission interhumaine plus facile.

La mort survient entre 3 et 10 jours pour la souche bangladaise (6 jours en moyenne) [15] et entre 3 et 31 jours pour la souche malaisienne (6,9 jours en moyenne) [60]. Elle est due à l'encéphalite sévère et la défaillance de nombreux organes dont le cœur, les reins et les poumons.

4. Autres

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

B. Lésions

1. Macroscopiques

Les lésions provoquées par le virus Nipah sont assez caractéristiques et ont permis de soupçonner l'émergence de ce nouveau virus. En effet, chez les cas malaisiens, pendant la phase d'encéphalite aiguë, les images du cerveau par résonance magnétique (IRM) montrent l'apparition de zones de haute intensité de 2 à 7 mm, distinctes, disséminées dans le cerveau et principalement en zones subcorticales et profonde de la matière blanche des hémisphères cérébraux. Ces changements signent de multiples lésions de micro-infarctus résultant de la vascularite généralisée des capillaires cérébraux [94] (cf. Figure 15). Au Bangladesh, on observe plutôt des lésions confluentes qui touchent à la fois la matière blanche et la matière grise [65] (cf. Figure 16).

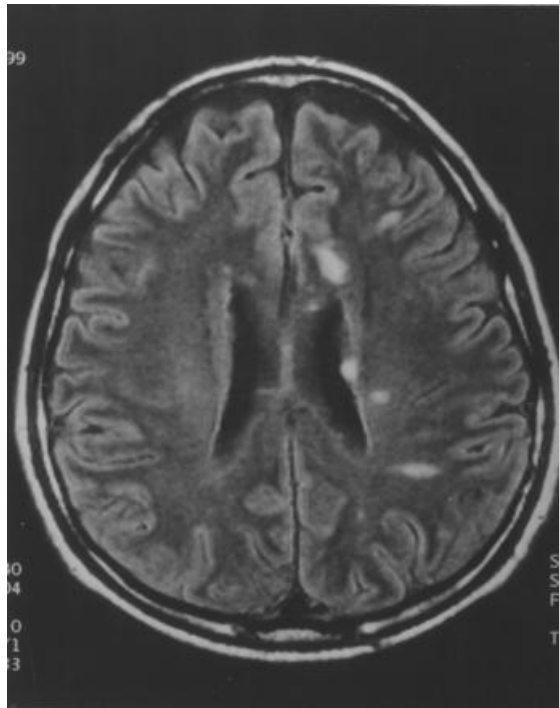


Figure 15 : Image par résonance magnétique du cerveau d'un homme malaisien de 44 ans atteint par le virus Nipah. L'image montre de multiples lésions subcorticales distinctes. Extrait de [94].

A l'autopsie, les lésions ne sont pas vraiment spécifiques et sont la conséquence d'une vascularite généralisée. On observe de multiples pétéchies et hémorragies sur la plèvre, les poumons, les reins et le cœur. On note aussi généralement de petites lésions nécrotiques assez caractéristiques, occasionnellement hémorragiques, disséminées sur le cerveau [95]. Chez le singe, on retrouve des lésions similaires : poumons consolidés

présentant des zones congestives et hémorragiques, œdème et hémorragies sur la paroi vésicale et le cerveau [2].

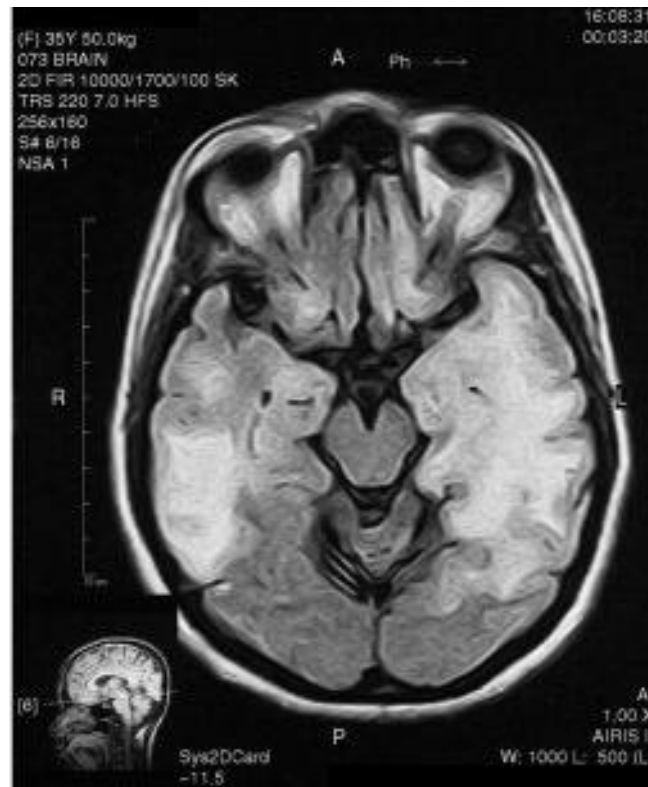


Figure 16 : Image par résonance magnétique du cerveau d'une femme bangladaise de 36 ans atteinte par le virus Nipah. L'image montre des anomalies de signal diffuses, confluentes en zones corticale et subcorticales. Extrait de [65].

Chez le porc, les lésions sont majoritairement pulmonaires avec des niveaux variables de consolidation, de l'emphysème et des hémorragies pétéchiiales ou des suffusions. Le cerveau peut présenter une congestion généralisée associée à de l'œdème. Plus rarement, les reins sont aussi congestionnés [9].

2. Microscopiques

A l'histologie, les lésions observées sont principalement de types hémorragique et nécrotique, même si le caractère majeur signant la présence du virus Nipah dans les tissus est la formation de cellules géantes multinuclées appelées syncytia. Ces syncytia sont issus de la fusion de plusieurs cellules et sont généralement identifiables par la présence de plusieurs noyaux, rassemblés au centre d'un cytoplasme abondant ou organisés en couronne (cf. Figure 17).

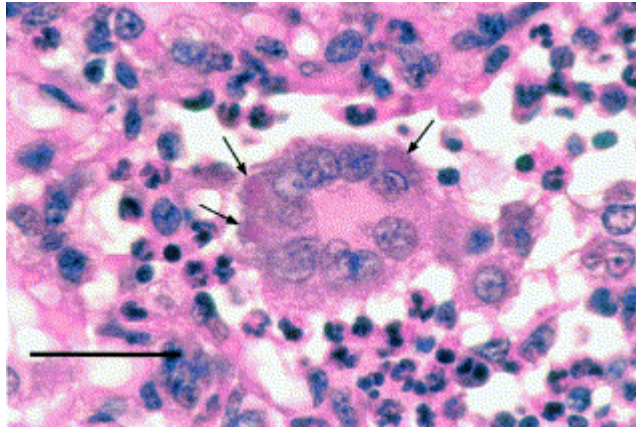


Figure 17 : Syncytium observé dans le tissu pulmonaire d'un porc infecté par le virus Nipah. Les flèches montrent des inclusions virales éosinophiliques. Barre = 50 μ m. Tiré de [67].

Les lésions sont observées dans de nombreux organes (cerveau, poumons, rate, reins, cœur, foie) et concernent fréquemment l'endothélium vasculaire. La vascularite associée à l'infection par le virus Nipah se caractérise par une destruction de l'endothélium, une nécrose murale souvent fibrinoïde, de la karyorrhexie et une infiltration inflammatoire de la paroi vasculaire par des polynucléaires neutrophiles et des cellules mononucléaires [95] (cf. Figure 18).

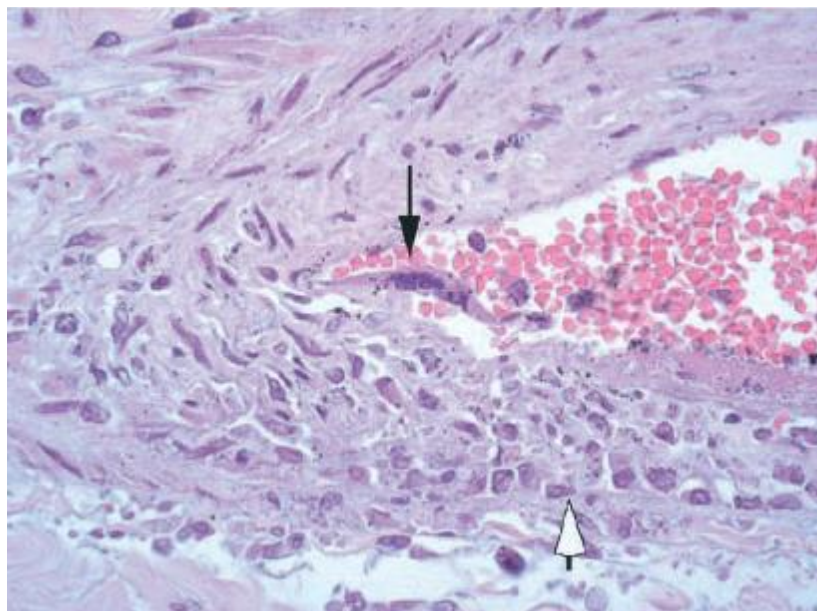


Figure 18 : Vascularite dans un vaisseau pulmonaire humain. La flèche noire montre un syncytium de cellules endothéliales et la flèche blanche montre une infiltration leucocytaire transmurale. Tiré de [95].

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

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

IV. Diagnostic de certitude en laboratoire

Les informations de cette partie sont entièrement tirées des recommandations et procédures officielles formulées par l'Office International des Epizooties (OIE) dans son Manuel des tests diagnostiques et vaccins pour les animaux terrestres de 2008 [96].

A. Identification de l'agent pathogène

1. Isolement du virus et caractérisation

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

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

a. Echantillonnage et traitement des échantillons

Les échantillons pour le diagnostic doivent être envoyés vers un laboratoire agréé dans des containers spéciaux. Selon l'association internationale de transport aérien (IATA), la réglementation pour les marchandises dangereuses (DGR, *Dangerous Goods Regulations*) doit être respectée pour l'envoi d'échantillons provenant d'une maladie zoonotique suspecte. Les tissus produisant du virus dans les cas naturels et expérimentaux ont été résumés (cf. Partie I. III. B.). Le cerveau, le poumon, le rein et la rate doivent toujours être envoyés. Les échantillons doivent être transportés sur de la glace ou à 4 °C s'ils peuvent arriver au laboratoire dans les 48 h suivant la collecte. Si le temps de transport est supérieur, les échantillons seront envoyés congelés sur carboglace ou dans des vapeurs d'azote liquide. Ils ne doivent pas être maintenus à -20 °C pendant une longue période.

b. Isolement en culture de cellules

La propagation du virus doit être conduite sous conditions de biosécurité de niveau 4. Le respect strict de cette condition limite les possibilités d'analyse d'échantillons à diagnostiquer quand la présence de virus Nipah peut être suspectée. Dès lors, l'isolement du virus à partir d'échantillons suspects peut être conduit si nécessaire sous conditions de biosécurité de niveau 3. Cependant, si ceci est tenté, des directives locales rigoureuses doivent être respectées pour assurer la sécurité de l'opérateur et appliquées si un « paramyxovirus-like » à effet cytopathogène (ECP) se développe dans les cultures infectées. De telles directives seront en accord avec les bonnes pratiques de laboratoire, et l'utilisation soit d'enceinte de sécurité biologique de classe II avec des combinaisons appropriées pour le personnel, soit d'enceinte de sécurité biologique de classe III. Il faut exiger une fixation à l'acétone des cellules infectées, pour détruire le virus infectieux, et pour ensuite permettre la détection par immunofluorescence des antigènes d'Henipavirus. Le milieu de culture

provenant de cellules positives aux Henipavirus doit être transféré dans un laboratoire de biosécurité de niveau 4.

Au laboratoire receveur, les tissus sont manipulés en conditions stériles, et des suspensions à 10 % (w/v) sont générées en broyant les tissus dans un système d'homogénéisation fermé, par exemple un stomacher/mélangeur utilisant un récipient en plastique ou un mélangeur broyeur utilisant des billes d'acier autoclavables dans des cylindres métalliques fermés. Toutes les manipulations doivent être réalisées dans des enceintes de sécurité biologique de classe III ou de classe II si le personnel est protégé de façon appropriée, le stomacher et les pots de centrifugation étant remplis et vidés dans l'enceinte. Ensuite, après clarification de l'homogénat par centrifugation à 300 g, le surnageant est ajouté à une culture de cellules en monocouche. L'isolement du virus est facilité par le fait que le virus Nipah se multiplie rapidement à haut titre en culture de cellules. Les cellules rénales de singe vert africain (Vero) et de lapin (RK-13) sont particulièrement sensibles. Un ECP se développe habituellement en 3 jours, mais un deuxième passage après 5 jours est recommandé avant de déclarer un échantillon négatif. En condition de faible multiplicité d'infection, l'ECP est caractérisé par la formation de syncytia qui peuvent, après 24 à 48 h, contenir 60 noyaux ou plus. Les syncytia formés par le virus Nipah sur les monocouches de cellules Vero sont significativement plus grands que ceux induits par le virus Hendra pendant le même délai. La distribution des noyaux dans les syncytia induits par le virus Nipah au début de l'infection ressemble à celle induite par le virus Hendra, avec les noyaux agglomérés au centre du syncytium. Ensuite, les noyaux dans les syncytia mûrs sont distribués en couronne au pourtour de la cellule géante.

c. Méthodes d'identification

Coloration immunologique des cellules fixées

La vitesse avec laquelle le virus Hendra et le virus Nipah se répliquent et la forte concentration d'antigènes viraux générés dans les cellules infectées font de l'immunofluorescence une méthode de choix pour identifier rapidement la présence d'Henipavirus par l'utilisation des sérums anti-Nipah ou anti-Hendra. A l'heure actuelle, le genre *Henipavirus* ne comprend que ces deux virus et il n'y a pas d'autres virus antigéniquement semblable connus. La réaction sérologique croisée entre les virus Hendra et Nipah signifie qu'un antisérum polyclonal envers l'un et l'autre virus ou un antisérum

mono-spécifique contre des protéines individuelles de l'un et de l'autre virus, ne peut pas faire la différence entre ces deux virus. Des anticorps monoclonaux (AcM) ont été générés et testés pour remplir cette fonction dans l'identification primaire du virus lors d'isolement. Ces AcMs sont aussi utilisés pour des examens immunohistochimiques de tissus provenant de cas suspects.

Immuno-microscopie électronique

Le titre élevé généré par les virus Hendra et Nipah dans les cellules *in vitro* permet leur visualisation dans le milieu de culture par microscopie électronique en contraste de phase négatif sans étape de concentration par centrifugation. La détection de complexes virus-anticorps par immuno-microscopie électronique fournit des informations précieuses sur la structure du virus et la réactivité antigénique, même durant le premier isolement du virus. D'autres techniques ultrastructurales sont possibles. La culture cellulaire sur grille peut être réalisée. Dans cette technique, les cellules sont cultivées, infectées et visualisées sur des grilles au microscope électronique. Il est aussi possible d'identifier la réplication des virus et des corps d'inclusion dans des coupes ultrafines de cultures cellulaires fixées.

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

Les tests de neutralisation reposent sur des méthodes de quantification. Trois procédures sont disponibles. Dans les méthodes de plages et de microtitrage traditionnelles, le titre est calculé respectivement par la technique des unités formant plages (UFP) et par la dose infectieuse capable de causer un ECP dans 50 % des puits inoculés (DICT50). Dans une procédure alternative, les virus sont titrés sur des monocouches de cellules Vero dans des plaques de 96 puits. Après 18 à 24 h, les foyers d'infection sont détectés immunologiquement sur les cellules fixées à l'acétone en utilisant un sérum anti-viral. Le titre viral est exprimé comme une unité formant un foyer (UFF)/ml.

Un isolat viral qui réagit avec un antisérum anti-Hendra et/ou anti-Nipah dans un test d'immunofluorescence est considéré comme sérologiquement identique à l'un et l'autre s'il présente la même sensibilité à la neutralisation par un antisérum anti-Hendra et anti-Nipah. L'antisérum anti-Hendra neutralise le virus Hendra à une dilution généralement 4 fois plus grande que celle qui neutralise le virus Nipah. Réciproquement, pour le virus Nipah. Une

nouvelle version du test de séroneutralisation différentielle a été décrite récemment qui évite la manipulation de virus infectieux par l'emploi de microbilles liées à l'éphrine-B2. Bien que ce test doive encore être validé formellement, il apparaît d'ores et déjà comme un outil de criblage utile dans les pays qui ne possèdent pas de structures de confinement de niveau 4.

a. Réduction du nombre de plages

Les stocks de virus Hendra et virus Nipah et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués dans un milieu. Les réplicats de chaque virus contenant approximativement 100 UFP dans 50 à 100 µl sont mélangés avec un volume égal constitué soit d'un milieu minimum essentiel de Eagle (EMEM), soit d'une série de dilutions d'antisérum anti- Hendra ou anti- Nipah dans du EMEM. Les mélanges virus-antisérum sont incubés à 37 °C pendant 45 min. Après cette incubation, les mélanges virus-dilutions sériques sont adsorbés sur des monocouches de cellules Vero à 37 °C pendant 45 min. Le nombre de plages est déterminé par des méthodes traditionnelles de plages après incubation à 37 °C pendant 3 jours.

b. Neutralisation par microtitrage

Encore une fois, les stocks viraux et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués de manière à obtenir des réplicats de chaque virus contenant approximativement 100 UFP dans 50 à 100 µl. Ces suspensions virales sont déposées dans des puits tests d'une plaque microtitre de 96 puits à fond plat. Les suspensions virales sont mélangées avec un volume égal de EMEM ou une série de dilutions d'antisérum anti-Hendra ou anti- Nipah dans du EMEM. Les mélanges sont incubés à 37 °C pendant 45 min. Après cette incubation, on ajoute environ $2,4 \times 10^4$ cellules à chaque puits pour atteindre un volume final d'environ 200 µl. Après 3 jours à 37 °C, le test est lu en utilisant un microscope inversé et les puits sont évalués selon le degré d'ECP observé. Ceux qui contiennent uniquement des cellules ou des cellules et de l'antisérum ne doivent pas montrer d'ECP. Au contraire, les puits contenant des cellules et du virus doivent montrer des syncytia et une destruction cellulaire. Un puits est considéré positif lorsque toutes les cellules de la monocouche ou une proportion d'entre elles forment des larges syncytia typiques d'une infection à Henipavirus.

c. Coloration immunologique des plages

Des cellules Vero (2×10^4 dans 200 μ l de milieu/puits) sont déposées dans des plaques à fond plat et sont cultivées durant la nuit à 37 °C. Les virus Hendra et Nipah de stock et les échantillons d'Henipavirus non identifiés sont dilués. Les réplicats contenant environ 60 FFU/50 μ l sont mélangés avec un volume égal soit de EMEM, soit d'une série de dilutions d'antisérum anti-Hendra et anti-Nipah diluées dans du EMEM. Les mélanges virus-antisérum sont incubés pendant 45 min à 37 °C. Après cette incubation, ils sont adsorbés aux monocouches de cellules Vero pendant 45 min à 37 °C. Les mélanges virus-antisérum sont enlevés, 200 μ l de EMEM sont ajoutés à chaque puits et l'incubation se poursuit à 37 °C. Après 18 à 24 h, le milieu de culture est aspiré et les plaques sont immergées dans de l'acétone pure froide pendant 10 min. Elles sont ensuite placées dans des bacs en plastique, qui sont remplis avec de l'acétone scellés à chaud et dont la surface est stérilisée avec 4 % (v/v) de lysol avant le retrait hors du laboratoire de niveau L4. Le glutaraldéhyde peut aussi être utilisé pour la stérilisation à une concentration de 0,1 % pendant 24 h. Il est recommandé que chaque laboratoire détermine la concentration de glutaraldéhyde nécessaire pour la stérilisation dans un intervalle de temps requis. Les plaques fixées à l'acétone sont séchées à l'air, les puits sont remplis avec une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) contenant 0,05 % de Tween 20 et 2 % de poudre de lait écrémé. Ils sont incubés pendant 30 min à 37 °C avec soit un antisérum de virus Hendra ou virus Nipah, soit un sérum monospécifique d'une protéine virale. Les anticorps anti-viraux liés aux syncytia peuvent être détectés en utilisant un anticorps spécifique d'espèce conjugué à une phosphatase alcaline et le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate et un substrat *p*-nitro bleu tétrazolium (NBT/BCIP ; Proméga, Numéro dans le catalogue S3771). Lorsque des plages violettes apparaissent sur un arrière-plan clair (10-30 min), le substrat est enlevé et les plaques sont rincées avec de l'eau distillée et séchée à l'air. Les plages sont comptées en utilisant une loupe binoculaire.

3. Méthodes de reconnaissance basée sur les acides nucléiques

Les génomes des deux virus Hendra et Nipah ont été entièrement séquencés, et des méthodes basées sur des PCR ont été utilisées pour détecter les virus et ont été validées dans un certain nombre de laboratoires. La PCR en temps réel apparaît être une approche sensible et utile pour la détection du génome d'Henipavirus dans les échantillons. En termes

de sécurité, cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter la multiplication de virus infectieux vivant. Les protocoles et les amorces dépendent du plateau technique et des produits chimiques disponibles dans les laboratoires.

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

L'immunohistochimie s'est révélée être une des épreuves les plus utiles dans la détection des virus Hendra et Nipah. Effectuée sur des tissus ou des cellules fixées au formol, cette méthode offre l'avantage d'être sûre du point de vue de la biosécurité. Elle permet par ailleurs des investigations rétrospectives sur du matériel archivé. Comme la réplication virale et la lésion primaire se produisent dans l'endothélium vasculaire, il existe une large gamme de tissus dans lesquels les antigènes des virus Hendra et Nipah peuvent être détectés. Idéalement une soumission pour l'immunohistochimie doit inclure des échantillons de différentes parties du cerveau, du poumon, des nœuds lymphatiques médiastinaux, de la rate et du rein. Chez les animaux gestants, l'utérus, le placenta et des tissus fœtaux doivent être inclus. Plusieurs antisérums anti- Hendra et Nipah peuvent être utilisés dans les études immunohistochimiques des tissus infectés, mais les sérums de lapin anti-Hendra et Nipah purifiés par la méthode des plages se sont révélés être particulièrement efficaces. Quelques AcMs sont aussi disponibles. Un système de détection biotine-streptavidine lié à une peroxydase est aussi envisageable. Le système de détection préféré est un réactif lié à un polymère dextran anti-lapin/anti-souris conjugué à une phosphatase alcaline.

B. Epreuves sérologiques

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

suffisante. Cependant, il est préférable d'avoir une approche harmonisée et normalisée pour la gestion de tous les échantillons plutôt que plusieurs méthodes différentes.

1. Test de séroneutralisation du virus

Les Henipavirus peuvent être quantifiés par des tests de plage de lyse, de microtitrage ou de plages colorées immunologiquement. Ces tests peuvent être modifiés pour détecter les anticorps spécifiques du virus (voir ci-dessus). Le test de neutralisation virale (SN) est accepté comme étant le test de référence. Pour le test de microtitrage, réalisé sous conditions de biosécurité L4, les sérums sont incubés avec du virus dans des puits d'une plaque 96 puits. Les cellules Vero sont ajoutées après cette incubation. Les puits incubés sont examinés en commençant par la dilution 1/2. Cependant, à cette dilution, une interférence liée à la cytotoxicité du sérum peut être observée. Lorsque l'échantillon est de mauvaise qualité, ou lorsque de faibles volumes sont disponibles (comme c'est souvent le cas avec les sérums de chauves-souris frugivores) une dilution initiale de 1/5 peut être utilisée. Les cultures sont lues après 3 jours d'incubation. Les sérums qui inhibent complètement le développement de l'ECP sont considérés positifs. En cas de cytotoxicité liée au sérum, le recours au test des plages de lyse révélées par coloration en immunofluorescence est l'alternative de choix. En effet, le mélange virus/sérum est retiré de la monocouche cellulaire après la période d'adsorption. De ce fait, leur cytotoxicité a un effet limité.

2. Épreuves immuno-enzymatiques

Les antigènes d'Henipavirus produits sur cultures cellulaires utilisés dans les tests immuno-enzymatiques (ELISA) sont irradiés au moyen de 6 Kgreys avant leur incorporation. Ce traitement affecte de manière importante le titre en antigène. En 1994, pour répondre à l'épidémie initiale à virus Hendra, un ELISA indirect a été développé. L'antigène était produit à partir de cellules infectées par le virus Hendra. Ces cultures infectées étaient soumises à plusieurs cycles de congélation-décongélation et traitées ensuite dans une solution à 0,1 % (w/v) de sodium dodécyl sulfate (P. Selleck, données non publiées). En 1999, le programme national de surveillance des porcs en Malaisie recourait à un ELISA similaire dans lequel l'antigène était obtenu par un traitement à base de détergent non ionique des cellules infectées par le virus Nipah. Par la suite et afin de contrôler les niveaux élevés d'activité de liaisons non spécifiques dans les sérums porcins, un ELISA modifié a été mis au point. Celui-ci

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

V. Prophylaxie

A. Prophylaxie socio-environnementale

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



Figure 19 : Nattes de bambou couvrant le dispositif destiné à récolter le sirop de palme et empêchant l'accès des chauves-souris. Tiré de [91].

Au Bangladesh, où le principal mode de contamination est lié à la consommation de sirop de palme, la commercialisation de ce jus a été provisoirement interdite [97]. Une solution moins draconienne consiste à favoriser l'emploi de nattes de bambous pour protéger les sites de saignée sur les palmiers [90] (cf. Figure 19). Cette technique, pourtant utilisée de façon ancestrale, avait peu à peu disparue par souci d'économie de travail. Sa réhabilitation constitue à l'heure actuelle la meilleure prophylaxie existante.

B. Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire est relativement efficace mais intervient souvent lorsque l'épidémie est déjà bien déclarée. Elle passe par une sensibilisation massive des populations aux règles de bonne pratique d'hygiène. Lors de l'épidémie malaisienne, les recommandations ont été diffusées par l'intermédiaire de la télévision, la radio, les écoles et la presse. Les autorités malaisiennes ont fait éditer des posters, livrets et dépliants explicatifs dans différentes langues qui ont été largement diffusés auprès des populations. Un site internet et une ligne téléphonique dédiée ont même été mis en place spécialement [98].

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

C. Prophylaxie médicale

Il n'existe à ce jour aucune prophylaxie médicale connue. Les tentatives de création de vaccins ne permettent pas d'envisager une application humaine à court terme [99,100] même si un vaccin recombinant utilisant un vecteur Canarypox s'avère très prometteur chez le porc [101]. Des peptides capables d'inhiber de façon compétitive la fusion de l'enveloppe du virus avec celle de la cellule ont vu le jour récemment et leur étude est encore en cours [102]. Une autre approche plutôt originale a été tentée avec la fabrication de « protocellules » qui servent de leurres. Le virus entre à l'intérieur de ces cellules artificielles grâce à l'expression des protéines d'attachement Ephrine B2 se trouvant en surface. Une fois à l'intérieur de cette fausse cellule, le virus se retrouve piégé et ne peut plus en sortir [103].

VI. Contexte d'étude

A. Classification du virus au niveau 4 de biosécurité

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

Tableau 3 : Classification des micro-organismes infectieux par groupe de risque (OMS) [104]

Groupe de risque 1 (risque faible ou nul pour les individus ou la collectivité)

- Micro-organisme qui, selon toute probabilité, ne peut causer de maladie humaine ou animale.

Groupe de risque 2 (risque modéré pour les individus, faible pour la collectivité)

- Germe pathogène capable de provoquer une maladie humaine ou animale mais qui ne présente vraisemblablement pas un sérieux danger pour le personnel de laboratoire, la collectivité, le bétail ou l'environnement. Une exposition en laboratoire est susceptible d'entraîner une infection grave, mais qui peut être traitée ou prévenue efficacement; par ailleurs le risque de propagation de l'infection est limité.

Groupe de risque 3 (risque important pour les individus, faible pour la collectivité)

- Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale, mais qui ne se transmet généralement pas d'un individu à l'autre. Il existe un traitement et des mesures préventives efficaces.

Groupe de risque 4 (risque important pour les individus comme pour la collectivité)

- Germe pathogène qui cause habituellement une grave maladie humaine ou animale et peut se transmettre facilement d'un individu à l'autre, soit directement, soit indirectement. Il n'existe généralement ni traitement, ni mesures préventives efficaces.

B. Le travail en conditions P4

Pour protéger efficacement les scientifiques qui travaillent sur les pathogènes de niveau 4 ainsi que les populations environnantes au laboratoire, le système de biosécurité du laboratoire est principalement basé sur l'existence de plusieurs niveaux d'enceintes hermétiques, dont la liaison est assurée par des sas de décontamination, et sur l'utilisation d'un système de contrôle des pressions. Les chercheurs ne travaillent jamais seuls et sont équipés d'un scaphandre étanche maintenu en surpression pour les protéger de toute contamination en cas de rupture éventuelle. Le laboratoire est lui-même maintenu en dépression afin de protéger l'environnement de toute fuite accidentelle. De plus, tous les déchets produits sont totalement inactivés chimiquement et stérilisés à la vapeur. L'air extrait est purifié par un système de double filtration absolue. La sécurité anti-incendie est fondée sur l'utilisation de détecteurs de fumée couplés à des injecteurs de gaz inerte qui privent l'incendie d'oxygène ; en l'absence de comburant, l'incendie s'arrête. L'activité du laboratoire est surveillée continuellement par des caméras reliées au Poste Central de Sécurité où une personne habilitée à entrer en zone P4 se tient prête à intervenir en cas d'incident.

C. Homologie entre souches virales malaisienne et bangladaise

Compte tenu de sa classification au niveau 4 de biosécurité, une des difficultés majeures liée à la recherche sur le virus Nipah concerne la disponibilité des souches virales. L'intégralité des travaux présentés dans cette thèse se fonde sur l'utilisation de la souche Nipah isolée en 1998 lors de la première épidémie en Malaisie. Malheureusement, le laboratoire n'a pas encore accès aux souches plus récentes des épidémies bangladaises qui présentent une homologie du génome viral de 91,8% avec la souche malaisienne [105]. L'homologie prédictive des différentes protéines virales est supérieure à 92% (cf. Tableau 4). Dans ce contexte, on peut imaginer que la souche actuelle qui sévit au Bangladesh réagit un peu différemment de celle qui est apparue initialement en Malaisie. Ceci constitue par ailleurs une des limites de notre étude.

Tableau 4 : Homologie prédictive des différentes protéines virales entre les souches malaisiennes et bangladaises du virus Nipah [105].

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

D. Les enjeux économiques liés aux épidémies de virus Nipah

Lors de la première épidémie en Malaisie en 1998-1999, les mesures sanitaires prises par les autorités malaisiennes ont conduit à l'abattage de 1,1 millions de porcs [9]. En dehors de la perte sèche pour l'industrie porcine estimée à 65,6 millions d'euros, c'est toute l'économie malaisienne qui a été malmenée. Ainsi, l'industrie de l'alimentation du bétail, le secteur agro-alimentaire (et particulièrement la portion huiles et graisses), le commerce de gros et de détail ou encore le secteur des transports ont tous subis des dommages qui portent l'estimation globale de cette crise à un coût de 126,8 millions d'euros [106].

Néanmoins ces chiffres sous-estiment encore largement le coût réel qui comprend les frais d'abattage et d'assainissement, les compensations pour les éleveurs ... Une étude publiée en 2003 [12] a estimé que cette crise a affectée le travail de 8500 personnes travaillant dans le secteur porcin, 9400 personnes supplémentaires travaillant dans les industries associées et 300000 personnes d'autres secteurs concernés par la crise soit un total de près de 318000 personnes mises au chômage ou dont les fermes et entreprises ont fait faillite.

Au Bangladesh, la source de primo-contamination a été identifiée comme étant le sirop de palme, issu de la saignée de palmiers dattiers locaux comme cela se pratique au Canada sur les érables. Depuis mars 2011, les autorités bangladaises ont interdit la vente de sirop de palme frais sur toute la surface du territoire [97]. La perte économique liée à cette interdiction pourrait s'élever à plus de 20 millions d'euros et avoir de dramatiques conséquences sur l'économie agricole déjà fragile de ce pays en voie de développement.

E. Utilisation du virus Nipah comme agent de bioterrorisme

A cause de son fort potentiel destructeur, ses signes cliniques neurologiques flagrants, son taux de létalité parmi les plus élevés du monde et la facilité déconcertante avec laquelle on peut le cultiver à haute concentration [107], le virus Nipah a très vite été envisagé comme une arme potentielle de bioterrorisme [12]. Bien qu'une transmission interhumaine ait été clairement identifiée avec la souche bangladaise [85], l'agro-bioterrorisme reste l'hypothèse la plus plausible et la plus destructrice car la morbidité chez le porc est proche de 100% [9]. Ce virus serait donc capable de réduire à néant toute la filière porcine et les industries plus ou moins directement dépendantes de l'industrie porcine en l'espace de quelques semaines. Les infections humaines secondaires seraient dans ce cas inévitables. Le virus Nipah a été classé par le *Center for Disease Control* (CDC) d'Atlanta (Etats-Unis) comme agent pathogène potentiel de bioterrorisme [108] au niveau 3 de priorité. Cette classification a permis d'augmenter considérablement les crédits alloués à la recherche sur ce pathogène et autoriser son étude dans les laboratoires P4 militaires, aux Etats-Unis notamment. En France, c'est la Direction Générale de l'Armement qui finance une partie des projets de recherche ayant lieu dans le laboratoire P4 « Jean Mérieux » de Lyon.

Partie II. Etude expérimentale : Vers la détermination d'un nouveau modèle animal

I. Intérêts et limites des modèles animaux existants

Parmi les modèles animaux existants, le hamster doré et les singes sont les seuls dont l'étude présente un réel intérêt pour l'avancée des connaissances sur la pathologie humaine liée au virus Nipah. Le cochon d'inde, le furet, le chat et l'embryon de poulet n'ont pas vraiment d'intérêt propre car les signes cliniques et pathologiques ne sont que très partiels et nécessitent l'utilisation de doses infectieuses très élevées. Le porc constitue un excellent modèle pour lui-même, car l'infection est très facilement reproductible en laboratoire, mais n'apporte que peu d'intérêt pour la modélisation de l'infection chez l'homme.

A. Les primates non-humains

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

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

Le singe vert africain ou grivet est un modèle animal largement utilisé dans la recherche. Il s'agit d'un singe d'environ 5 kg qui habite les savanes d'Afrique subsahariennes. Son utilisation en tant que modèle pour l'étude de la pathogénèse liée au virus Nipah a été envisagée en raison de la forte capacité du virus à se répliquer dans les cellules Vero, qui sont dérivées du grivet. Lors d'une infection par voie intratrachéale avec des doses allant de $2,5 \cdot 10^3$ ufp à $1,3 \cdot 10^6$ ufp, on observe une mortalité de 87,5 % à 12 jours [2]. Les animaux présentent un syndrome de détresse respiratoire aigu associé à la production d'écume sanguinolente dans le nez et la bouche (cf. Figure 20 A).

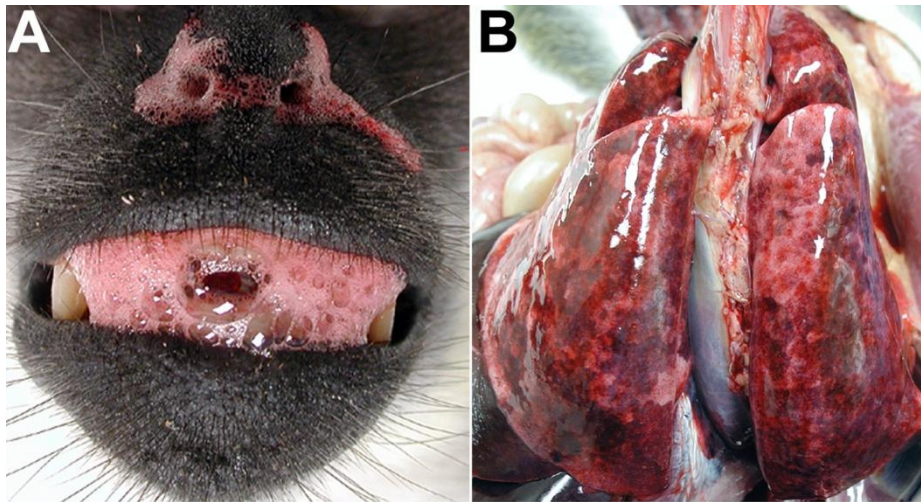


Figure 20 : [A] Sécrétions mousseuses sanguinolentes autour des narines et de la bouche. [B] Poumons hypertrophiés avec de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées. Extrait de [2].

A l'autopsie, les poumons sont hypertrophiés et œdémateux ; ils présentent de nombreuses zones hémorragiques et congestionnées (cf. Figure 20 B). On retrouve de la fibrine sur les plèvres. La vessie, lieu d'excrétion viral chez la chauve-souris, est particulièrement œdémaciée et présente de nombreuses pétéchies. La plupart des organes présentent des signes liés à la vascularite systémique. Le cerveau est sévèrement congestionné avec des hémorragies méningées et de l'œdème (cf. Figure 21 A).

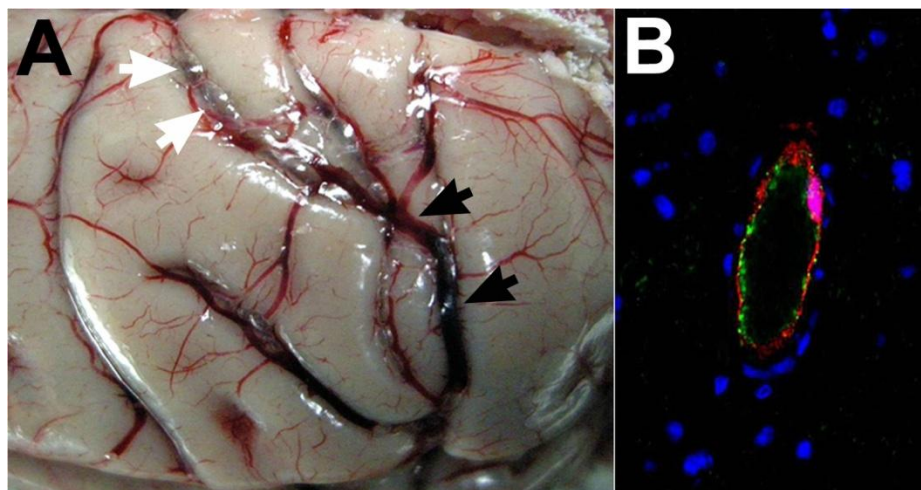


Figure 21 : [A] Cerveau présentant une congestion sévère (flèches noires) avec de possibles hémorragies méningées. Fluide (flèches blanches) suggérant l'existence d'un œdème modéré des méninges. [B] Double marquage d'un vaisseau sanguin cérébral montrant la colocalisation du virus Nipah dans les cellules endothéliales : cellule endothéliale (vert) et antigènes du virus Nipah (rouge), contre-coloration DAPI (bleu). Grossissement x400. Extrait de [2]

A l'échelle cellulaire, on observe à partir de 3-4 jours la formation de syncytia et la présence du virus dans de nombreux organes incluant la langue, les glandes salivaires, le larynx, la trachée, le cœur, la rate, la vésicule biliaire, les reins, les organes reproducteurs, les glandes pituitaires et adrénales, l'estomac, les intestins et les muscles squelettiques. Dans le cerveau, ce sont principalement les neurones et les vaisseaux sanguins qui sont infectés (cf. Figure 21 B).

2. Le saïmiri (*Saimiri sciureus*)

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

B. Le hamster doré (*Mesocricetus auratus*)

Comme cité précédemment, le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) a été le premier modèle animal de petite taille validé pour les études de pathologie [4]. Les signes cliniques sont essentiellement neurologiques et systémiques et correspondent à ceux observés chez l'homme : hyperthermie, perte de poids, tremblements, paralysie, myoclonies, léthargie, ... La mort survient entre 5 à 9 jours après l'injection intrapéritonéale du virus (100 à 1000 ufp) et 24h après l'apparition des premiers signes cliniques. La dose létale 50 est établie à environ 7 ufp [5]. Les lésions observées à l'autopsie concernent majoritairement le cerveau et montrent une forte inflammation associée à des hémorragies et de l'œdème. L'histologie et l'immunohistochimie révèlent la présence du virus Nipah dans de très nombreux organes

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

Par comparaison avec ce que l'on observe chez l'homme lors d'infection par le virus Nipah, le hamster constitue donc un excellent modèle animal. Il est petit, peu coûteux, facilement manipulable, ne nécessite qu'une faible dose infectieuse et mime très bien la pathologie humaine. Son majeur défaut est lié à l'absence quasi-totale de connaissances et d'outils immunologiques développés pour cette espèce. En effet, contrairement aux rongeurs conventionnels de laboratoire (rats et souris), le génome du hamster n'est que très partiellement séquencé et annoté. Cette limite interdit donc, de fait, toute étude transcriptomique ainsi que la dissection des cascades immunologiques engendrées par la présence du virus. Il s'agit là d'un frein majeur à l'avancée des connaissances sur la physiopathologie du virus Nipah. En outre, une grande quantité de réactifs chimiques et immunologiques (anticorps de marquage, inhibiteurs protéiques, ...) ne sont disponibles que pour les rats et souris, ce qui limite une fois de plus la possibilité pour les chercheurs d'aller identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'infection.

Un modèle animal idéal pour l'étude des mécanismes physiopathologiques liés à l'infection par le virus Nipah aurait donc été la souris. En effet, comme dit précédemment, les connaissances et les outils sur cette espèce sont nombreux et aisément disponibles. Néanmoins, malgré l'existence des récepteurs Ephrine B2 et B3 sur les cellules murines [6], la souris n'est pas considérée comme une espèce infectable par le virus Nipah, ni expérimentalement [4], ni naturellement [15,50].

II. La souris transgénique IFNAR KO

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

C'est le cas de la lignée IFNAR KO. Dans cette lignée murine (A129) rétrocroisée sur un fond génétique C57BL/6, l'expression du récepteur à l'interféron de type I (IFNAR) est annihilée [109]. Ce récepteur, lorsqu'il est activé par de l'interféron de type I, permet l'activation des gènes ISG (*Interferon Stimulated Genes*) à l'origine de l'expression de protéines cellulaires antivirales. Ces protéines vont préparer la cellule et l'aider à lutter contre l'infection, déjà présente dans la cellule ou imminente. Le récepteur IFNAR joue donc un rôle prépondérant dans l'immunité antivirale innée et son absence diminue très fortement le pouvoir de cette réponse. Ce type de modèle a déjà largement été utilisé pour étudier le rôle de la réponse interféron dans les maladies d'origine virale [109–111].

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés à évaluer l'intérêt de l'utilisation de ces souris transgéniques (dont l'immunité innée est déficiente) pour l'étude des paramètres physiopathologiques liés à l'infection par le virus Nipah.

III. Matériel et méthodes

A. Infection des souris

Des groupes de 5 souris ont été constitués pour l'étude. Ils comprennent :

- d'une part, des souris déficientes pour le récepteur à l'interféron de type I (IFNAR KO) de lignée A129 rétrocroisée avec un fond génétique C57BL/6 (PBES, Lyon, France), âgées de 8 et 10 semaines pour les groupes testés, les témoins négatifs ayant 20 semaines.
- d'autre part, des souris de lignée C57BL/6 (souche sauvage) (PBES, Lyon, France), âgées de 18 et 20 semaines.

Les deux types de souris ont été anesthésiés par isoflurane puis infectés dans le laboratoire P4 "Jean Mérieux" :

- soit par voie intrapéritonéale (i.p.) avec 0,4 ml de virus Nipah de souche sauvage (isolat malaisien UMMC1, Genbank AY029767),
- soit par voie intranasale (i.n.) avec 20 µl du même isolat viral (10 µl dans chaque narine),
- soit par voie intracérébrale (i.c.) avec 50 µl du même isolat viral.

L'estimation de la dose létale 50 % (DL₅₀) pour les souris IFNAR KO a été déterminée par l'utilisation de doses de virus croissante (en log₁₀) allant de 50 à 5.10⁵ unités formant plaque (ufp). Chez les souris C57BL/6, une dose unique de 5.10⁵ ufp a été injectée, soit par voie i.c. soit par voie i.p. Tous les animaux ayant survécu sont euthanasiés 21 jours après l'inoculation virale. L'ensemble des animaux utilisés au cours de cette expérience ont été manipulés dans le parfait respect des règles de bonne pratique de laboratoire telles que définies par la charte nationale d'éthique animale. Toutes les expériences de ce projet ont été soumises à l'accord du comité régional d'éthique (CECCAP, Lyon, France).

B. Histologie et immunohistochimie

Les organes prélevés lors de l'autopsie ont été fixés dans une solution tamponnée de paraformaldéhyde à 4 % pendant 2 semaines puis inclus en paraffine. Les sections de 6 µm ont été déparaffinées par le xylène et réhydratées par des bains successifs à concentration d'éthanol décroissante et d'eau distillée.

Pour l'histologie, les lames ont été colorées à l'éosine B (0,1 %) puis contrecolorée par un bain rapide dans de l'hématoxyline modifiée de Harris (Sigma- Aldrich, France) et rincées à l'eau courante. Les lames colorées ont ensuite été déshydratées par des bains successifs à concentration d'éthanol croissante et de xylène. Les échantillons ont enfin été montés par de la résine de montage DPX et une lamelle. Les lames ont été analysées avec un microscope Axioscope équipé du logiciel Zeiss Axiovision (Zeiss, Allemagne).

Pour l'immunohistochimie, les lames déparaffinées ont été traitées dans un bain de citrate de trisodium tamponné (10 mM, pH 6) pendant 20 minutes à 99°C afin de démasquer les antigènes. Les lames ont ensuite été lavées 3 fois dans du PBS 1X. Les peroxydases endogènes ont été bloquées par l'utilisation d'eau oxygénée à 3 % dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante puis les lames ont été rincées à l'eau courante. Un blocage des sites de capture des anticorps a été réalisé avec de l'albumine de sérum bovin à 3 % dans du PBS, pendant 20 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps de lapin dirigés contre la protéine C du virus Nipah (anti-NiV C) et purifiés (Covalab, Villeurbanne, France). Ces anticorps primaires ont été dilués à 1 :500 dans du PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin et déposés sur les lames. La préparation est alors incubée à 4°C durant la nuit. Après 3 lavages dans le PBS 1X, les lames sont incubées pendant 1 à 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire, un anticorps

caprin couplé à la peroxydase HRP et dirigé contre les anticorps de lapin, dilué à 1 :500. La révélation est effectuée avec un kit AEC (Vector Labs, USA) pendant 20 minutes, puis les lames sont rincées à l'eau distillée avant d'être contrecolorées pendant 30 secondes à l'hématoxyline modifiée de Harris (Sigma- Aldrich, France) diluée au 1 :3 dans du PBS. Après un rinçage de 3 minutes à l'eau courante, les lames sont montées avec du milieu de montage aqueux Faramount (Dako, Danemark) et une lamelle puis analysées dans les mêmes conditions que pour l'histologie.

C. PCR quantitative par transcription inverse

10 à 30 mg des organes des souris témoins et infectées par le virus ont été lysés mécaniquement dans un tampon de RLT contenant 1 % de β -mercaptoethanol conformément aux recommandations du fabricant (Qiagen, France). L'ARN total a ensuite été extrait avec le mini kit RNeasy selon les recommandations du fabricant en incluant l'étape supplémentaire avec la RNase-free DNase (Qiagen, France).

La transcription inverse a été réalisée à partir de 0,5 μ g d'ARN total en utilisant le kit de synthèse iScript cDNA (Biorad, USA) et un appareil à PCR Biometra® T-GRADIENT. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ont ensuite été dilués au 1/10. La PCR quantitative a été effectuée avec du Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG avec kit ROX (Invitrogen, USA) sur une machine PCR STEPONE PLUS (Applied biosystems, USA). Le protocole utilisé a été le suivant : 95°C 5', et 40 cycles à 95°C 15'', 60°C 1', suivi d'une courbe de fusion jusqu'à 95°C avec des intervalles de 0,7°C. Tous les échantillons ont été testés en duplicats et les résultats ont été analysés avec le logiciel STEPONE SOFTWARE v2.1 disponible à la plateforme d'analyse génétique (SFR BioSciences Lyon-Gerland, France).

Le gène de la glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase murine (mGAPDH) a été utilisé comme gène de ménage pour la quantification de l'ARN et sa normalisation. La mGAPDH et un standard de référence du gène d'intérêt a été inclus dans chaque expérimentation pour permettre la standardisation des résultats en fonction de l'intégrité de l'ARN déposé, de sa quantité et des variations inter-PCR possibles. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Beacon 7.0 et préalablement validés avec une efficacité proche de 100 % :

- NiV N for: GGCAGGATTCTTCGCAACCATC,
- NiV N rev: GGCTCTTGGGCCAATTTCTCTG,
- mGAPDH for: GCATGGCCTTCCGTGTCC,
- mGAPDH rev: TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT.

L'expression relative représente le ratio du nombre de copies d'ARN d'intérêt sur le nombre de copies d'ARNm de mGAPDH. Tous les calculs ont été effectués en utilisant le modèle $2^{\Delta\Delta CT}$ de Pfaffl [112] et toutes les expériences ont été faites selon le guide de bonne pratique de la PCR MIQE [113].

D. Test de séroneutralisation

La détermination du titre en anticorps neutralisants spécifiques du virus Nipah a été réalisée en diluant les sérums murins de 2 en 2 (pur, au $\frac{1}{2}$, puis au $\frac{1}{4}$, etc ...). Ces dilutions ont été réalisées en duplicat dans des plaques 96 puits. Les sérums ont ensuite été incubé avec le virus Nipah (25 UFP/puits) pendant 60 minutes à 37°C dans du DMEM supplémenté avec 2% de sérum fœtal de veau. Après l'ajout de $2,5 \cdot 10^4$ cellules Vero dans chaque puits, les plaques 96 puits ont été incubées pendant 4 à 6 jours à 37°C. Le titre en anticorps neutralisants est exprimé comme la dilution maximale permettant une inhibition complète des effets cytopathiques liés au virus.

IV. Validation du modèle

A. A l'échelle macroscopique

1. Etude des signes cliniques

Les signes cliniques observés chez la souris IFNAR KO (cf. Tableau 5) commencent à apparaître 5 jours après l'infection et correspondent relativement bien à ceux observés chez d'autres modèles, notamment chez le hamster. Ils varient, du trouble comportemental jusqu'aux atteintes neurologiques sévères, en fonction du temps et de la dose infectieuse utilisée.

Tableau 5 : Signes cliniques observés chez les souris IFNAR KO infectées par le virus Nipah.

Troubles du comportement	Signes de douleur	Signes neurologiques
Agitation	Faciès douloureux	Stéréotypie
Bondissement	Lordose	Port de tête incliné
Nervosité	Agressivité	Troubles locomoteurs
Défaut de toilette	Prostration	Paralysie

La perte de poids semble être un bon marqueur prédictif de mort. En effet, toutes les souris qui sont mortes pendant l'expérience ont présenté une chute importante de leur poids (15 à 25%) juste avant leur mort, telle que décrite dans la Figure 22. Dans ce groupe, les souris infectées (n° 1 à 5) avaient 9 semaines (phase de croissance) au démarrage de l'expérience alors que la souris témoin était âgée de 20 semaines. Ceci explique pourquoi les souris 1 à 5 prennent du poids alors que la souris témoin stagne à son poids adulte.

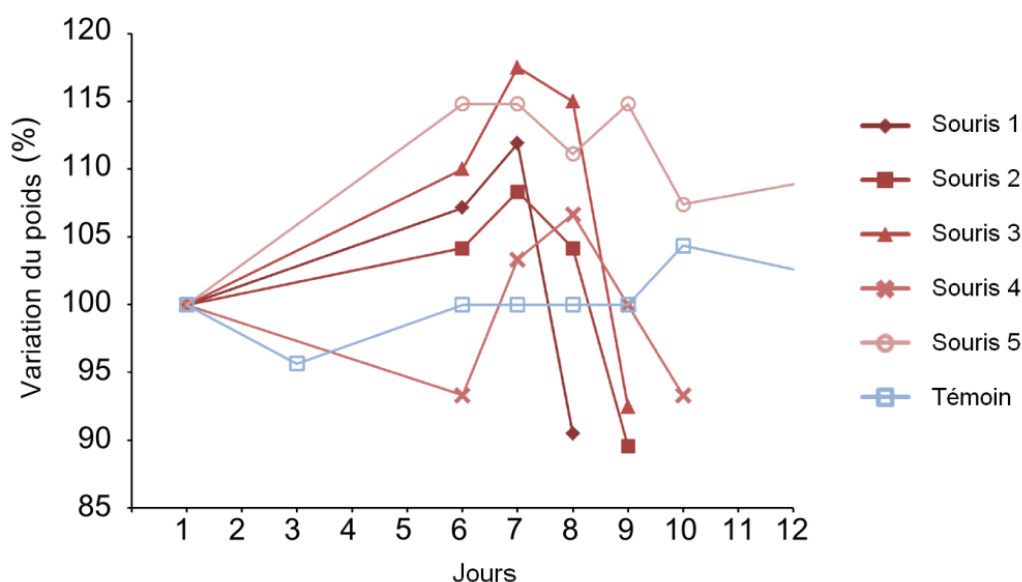


Figure 22 : Variation journalière individuelle du poids des souris IFNAR KO utilisées pour la détermination de la D.L.₅₀ et infectées i.p. avec 5.10^4 ufp de virus Nipah. Le graphique présente la chute de poids juste avant la mort. Les symboles vides représentent les souris ayant survécus. La souris non infectée (Témoin) est présentée en bleu.

2. Suivi de la mortalité

En parallèle des études sur les souris IFNAR KO, nous avons voulu vérifier si la résistance des souris de souche sauvage vis-à-vis du virus Nipah était dépendante de la voie de pénétration du virus. Des groupes de 5 souris C57BL/6 ont donc été respectivement inoculés avec 5.10^5 ufp de virus Nipah par voie intracérébrale ou par voie intrapéritonéale.

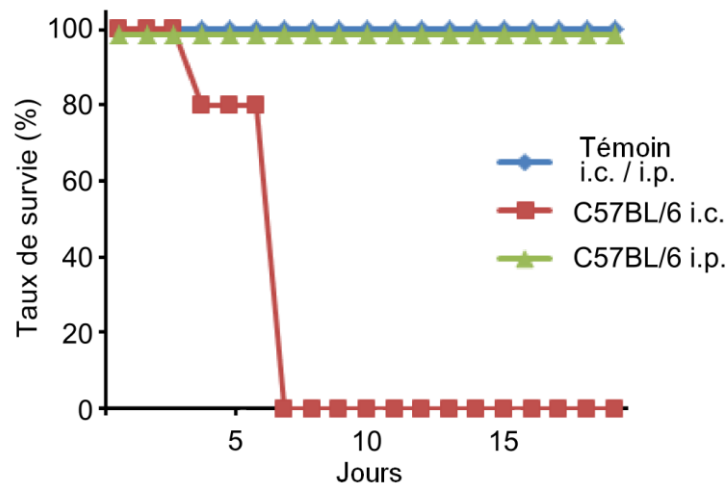


Figure 23 : Suivi de la mortalité des souris de souche sauvage C57BL/6 infectées par voie intracérébrale ou intrapéritonéale avec 5.10^5 ufp de virus Nipah. 5 souris par groupe.

Nos résultats démontrent que les souris de la souche sauvage C57BL/6 sont susceptibles à l'infection par le virus s'il est inoculé par voie intracérébrale. Dans ce cas, 100% des souris meurent dans les 6 jours après l'inoculation. En revanche, si le virus est inoculé par voie intrapéritonéale toutes les souris survivent (cf. Figure 23).

Nous pensons que l'interféron (IFN) joue un rôle majeur dans la résistance des souris sauvages à une infection naturelle par le virus Nipah. Nous avons donc voulu déterminer si la voie d'entrée du virus Nipah chez la souris IFNAR KO conditionne la susceptibilité de ce modèle à la maladie. Nous avons donc infecté 3 groupes de 5 souris IFNAR KO respectivement par voie intracérébrale, intrapéritonéale et intranasale à la dose de 5.10^5 ufp de virus Nipah. Chez la souris IFNAR KO, l'infection est effective par toutes les voies mais sa vitesse d'évolution varie en fonction du lieu d'inoculation. En effet, à cette dose, l'injection du virus par voie i.c. conduit à la mort de 100% des individus en moins de 4 jours, l'inoculation par voie i.p. conduit aussi à 100% de mortalité mais en 9 jours et l'inoculation par voie intranasale mène à un taux de survie de 40% à 21 jours (cf. Figure 24).

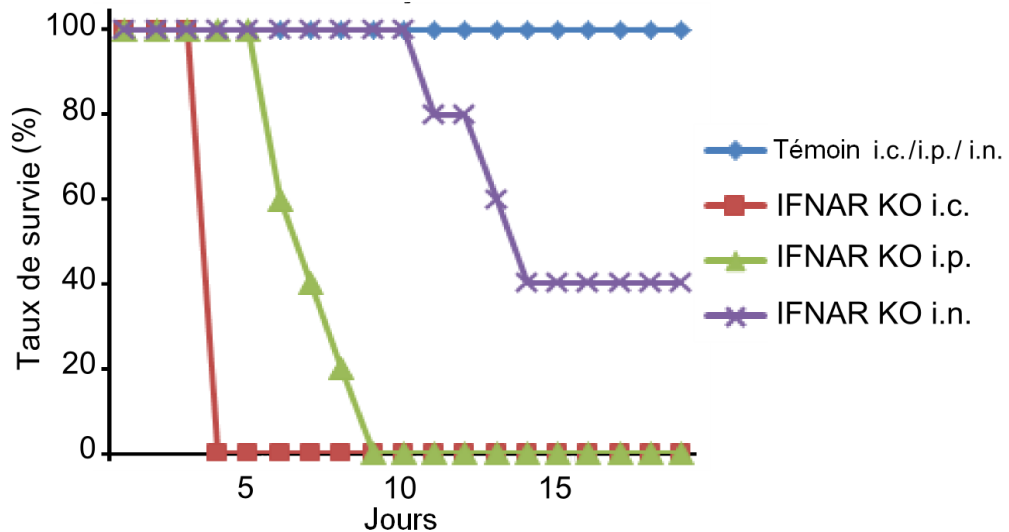


Figure 24 : Suivi de la mortalité des souris IFNAR KO infectées par voie intracérébrale, intrapéritonéale ou intranasale avec 5.10^5 ufp de virus Nipah. 5 souris par groupe.

Par comparaison avec les souris C57BL/6, les souris IFNAR KO présentent une susceptibilité très augmentée à l'infection par le virus Nipah, quelle que soit la voie d'inoculation ($p < 0,001$, Test du χ^2). Même si la dose d'inoculum viral utilisée est relativement élevée (5.10^5 ufp), il est intéressant de noter que l'infection par voie i.n. est possible dans le modèle IFNAR KO. Ceci permet d'envisager l'utilisation de ce modèle pour étudier les modes naturels de transmission du virus.

Enfin, nous avons mené une étude visant à déterminer la dose létale 50% de ce modèle (DL_{50}). Cette expérience permettra de pouvoir utiliser par la suite la dose la plus adaptée pour infecter les animaux avec certitude et de pouvoir comparer la susceptibilité de ce modèle avec celle des autres modèles animaux existants. Nous avons donc suivi la mortalité sur 21 jours dans des groupes de 5 souris IFNAR KO inoculés par voie i.p. avec des doses croissantes de virus Nipah, allant de 5.10^1 à 5.10^5 ufp (cf. Figure 25).

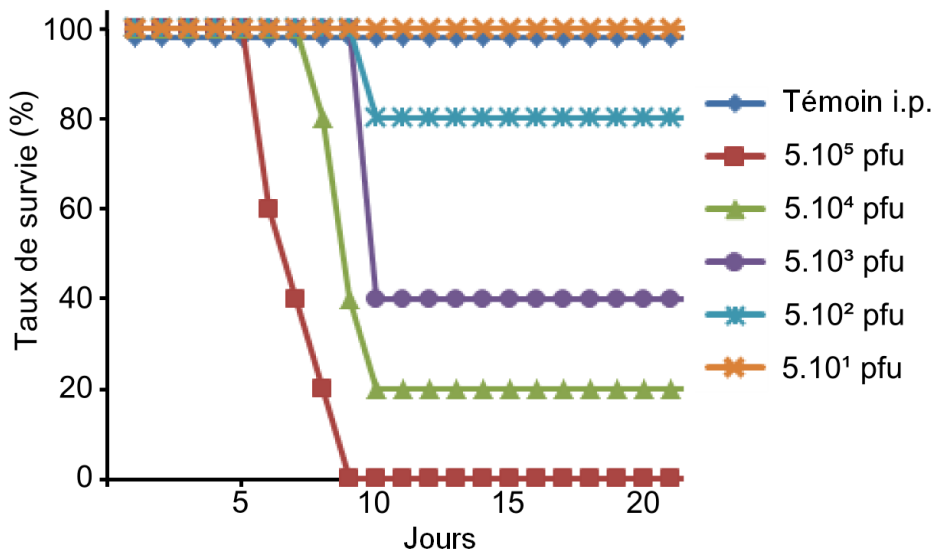


Figure 25 : Détermination de la dose létale 50% du virus Nipah inoculé par voie intrapéritonéale chez la souris IFNAR KO. 5 souris par groupe.

Tous les animaux ayant reçu la plus haute dose sont morts entre 6 et 9 jours après l'inoculation. Après 10 jours, plus aucune mortalité n'est à déclarer dans chacun des groupes et malgré l'apparition de quelques signes cliniques, une souris du groupe 5.10^3 ufp s'est rétablie après environ une semaine de convalescence. Ces résultats suggèrent que la DL_{50} pour le virus Nipah injecté par voie i.p. chez la souris IFNAR KO se situe entre 5.10^2 et 5.10^3 ufp et que la mort intervient dans les 10 premiers jours qui suivent l'inoculation.

3. Examen nécropsique

L'examen nécropsique des souris IFNAR KO infectées par le virus Nipah révèle une congestion sévère du cerveau (Figure 26 G) et du cœur associée à de petites lésions hémorragiques diffuses. Les lésions hépatiques regroupent de multiples zones de nécrose focale ainsi que des pétéchies. Il en va de même pour les reins. Moins fréquemment, on peut observer une congestion des poumons et un œdème de la paroi vésicale.

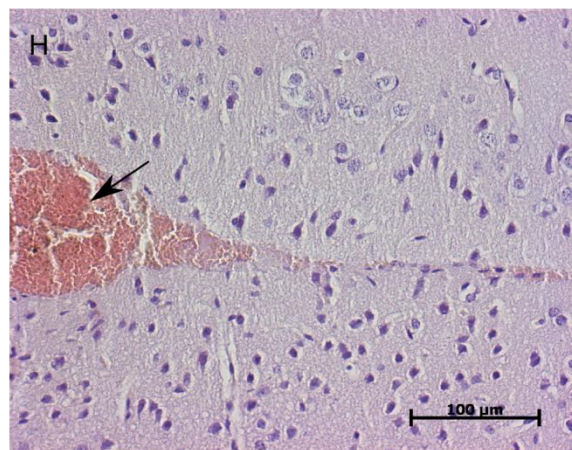
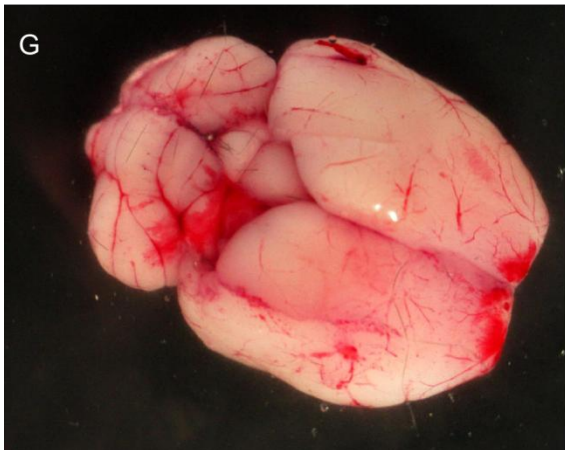
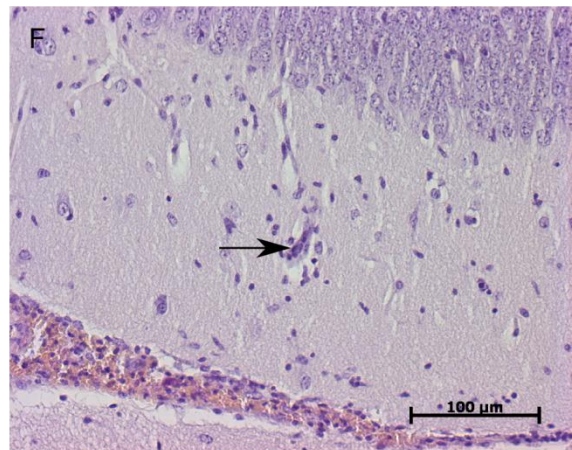
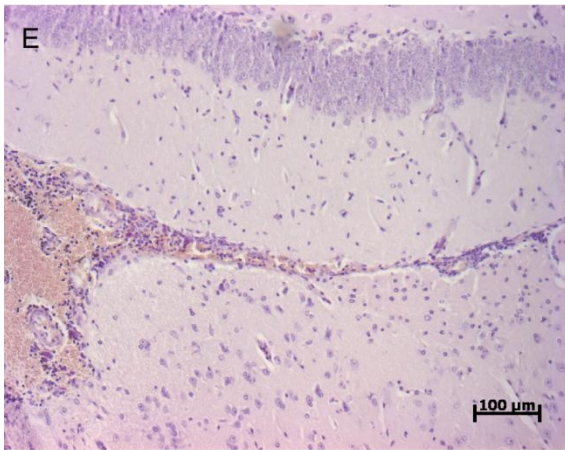
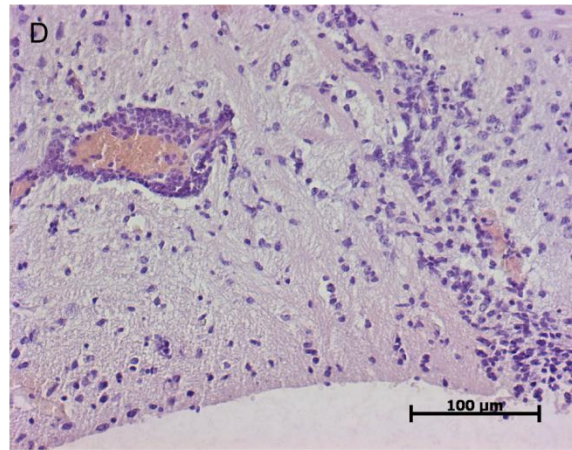
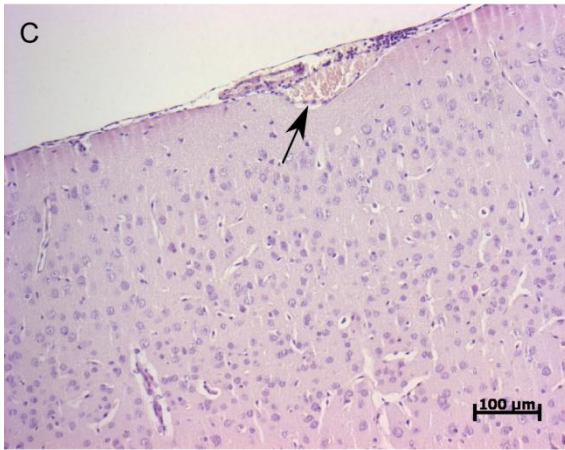
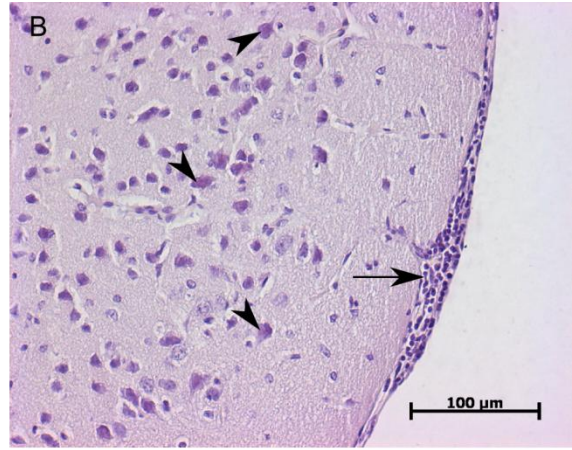
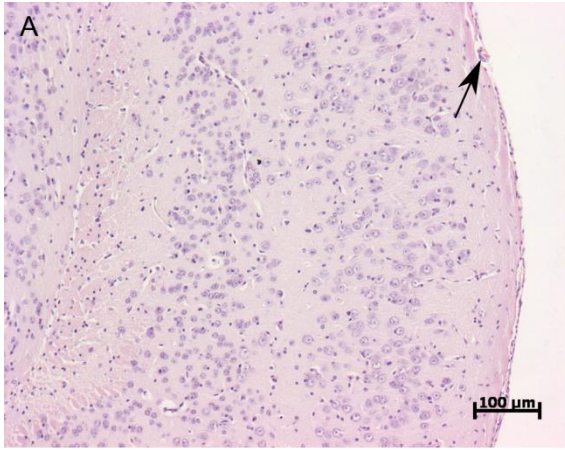
Les souris C57BL/6 infectées présentent systématiquement une splénomégalie alors que cette observation n'a jamais été faite pour les souris IFNAR KO. Aucun autre signe clinique ou lésion macroscopique n'est observable chez les souris C57BL/6 inoculées par voie intrapéritonéale.

B. A l'échelle microscopique

A l'histologie, on observe clairement une sévère inflammation non suppurative des méninges (Figure 26 B) et du parenchyme cérébral (Figure 26 D) chez les souris IFNAR KO infectées par le virus Nipah. Les lésions vasculaires sont caractérisées par une forte vascularite souvent associée à des hémorragies (Figure 26 H) et une infiltration leucocytaire (Figure 26 D). Les neurones situés à proximité des lésions de vascularite et des lésions méningées présentent des inclusions éosinophiliques (Figure 26 B) suggérant un état hypoxique-ischémique dans le cerveau. L'existence de cellules géantes multi-nucléées suggère la présence de syncytia liés à l'infection par le virus Nipah (Figure 26 F). Les études immunohistochimique (IHC) du cerveau révèlent des cellules infectées, très certainement des neurones ou des cellules gliales, particulièrement à proximité des zones de méningites (Figure 27 A).

Dans les poumons, on observe une inflammation intense avec des lésions d'alvéolite nécrotique et de vascularite (Figure 28 B). L'IHC révèle la présence des antigènes du virus Nipah dans différents types cellulaires, notamment dans les pneumocytes de type I et II (Figure 27 B), mais aussi dans les cellules de l'épithélium pseudo-stratifié. Les lésions hépatiques observées à l'histologie sont particulièrement sévères avec des signes d'hépatite aiguë. Les lésions sont particulièrement abondantes dans le foie où l'on observe une nécrose focale, une vascularite, de larges syncytia, des hémorragies et une forte inflammation (Figure 28 D). L'IHC du foie révèle des cellules infectées dont l'identification n'est pas claire (Figure 27 C). La rate des animaux infectés présente une disparition de l'architecture folliculaire normale et l'existence de nombreux syncytia, particulièrement dans la région de la pulpe blanche (Figure 28 F). L'IHC montre que les antigènes du virus Nipah sont principalement situés dans les syncytia (Figure 27 D). L'histopathologie des reins révèle une inflammation modérée associée à une légère vascularite (données non présentées).

Figure 26 (ci-contre) : Pathologie liée à l'infection aiguë par le virus Nipah dans le cerveau de souris IFNAR KO infectées par 5.10^4 ufp par voie intrapéritonéale. (A) Témoin, avec vaisseaux sanguins normaux (flèche). (B) Méningite non suppurée (flèche). Neurones avec inclusions éosinophiliques (têtes de flèche). (C) Méningovascularite (flèche). (D) Inflammation du parenchyme associée à une vascularite. (E) Hémorragie dans le parenchyme cérébral et inflammation. (F) Grossissement de E montrant une cellule géante multi-nucléée (flèche). (G) Observation macroscopique de lésions hémorragiques et d'une congestion sévère du cerveau. (H) Hémorragie du parenchyme (flèche).



Dans les souris C57BL/6, les résultats des études histologiques sont très pauvres pour les animaux infectés par voie intrapéritonéale (par comparaison avec les animaux sains) malgré une très légère inflammation dans le cerveau (données non présentées). L'IHC ne permet pas de mettre en évidence d'antigènes du virus dans les tissus.

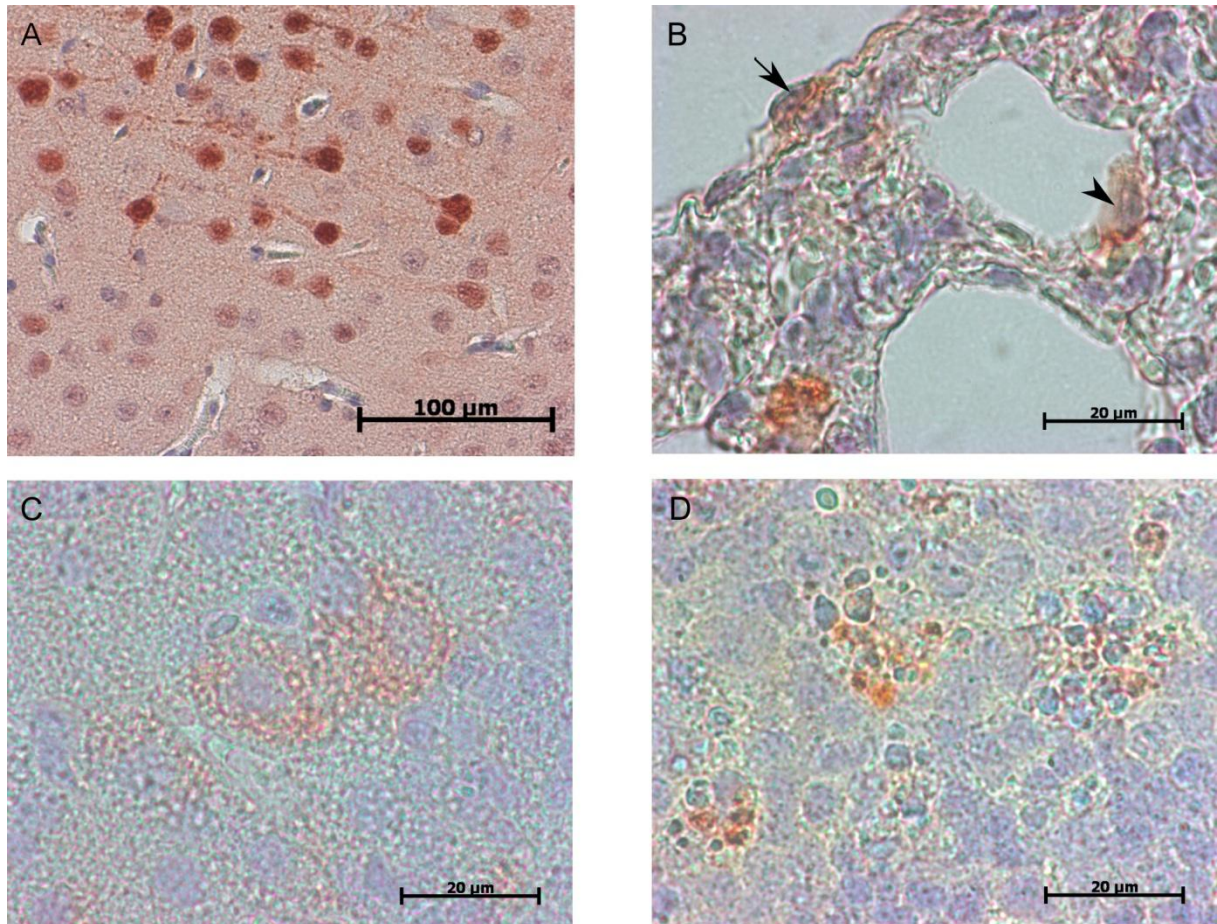
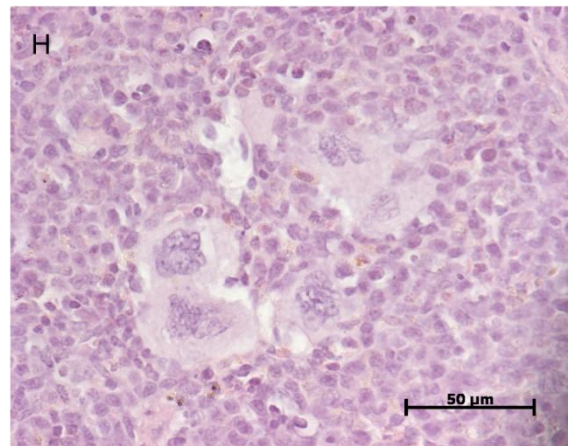
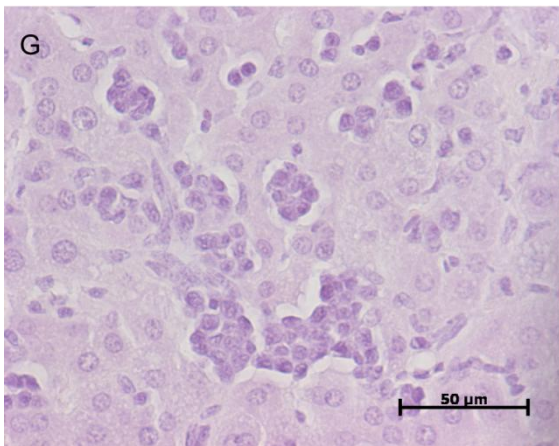
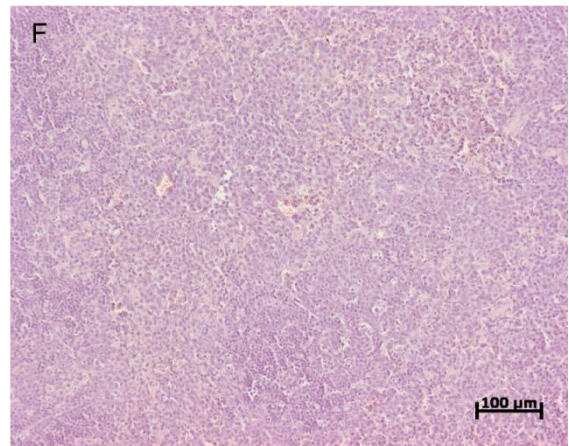
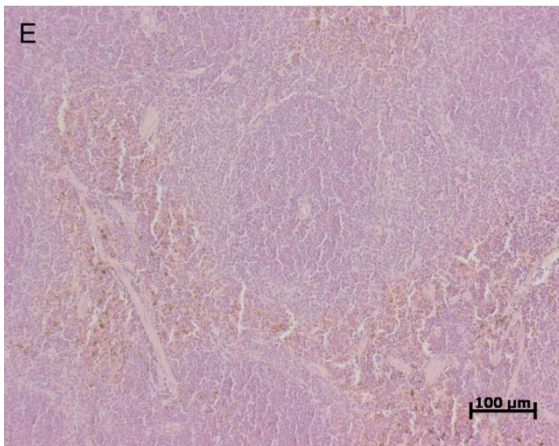
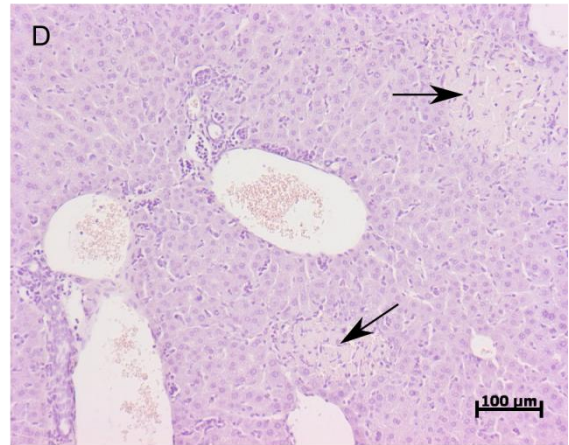
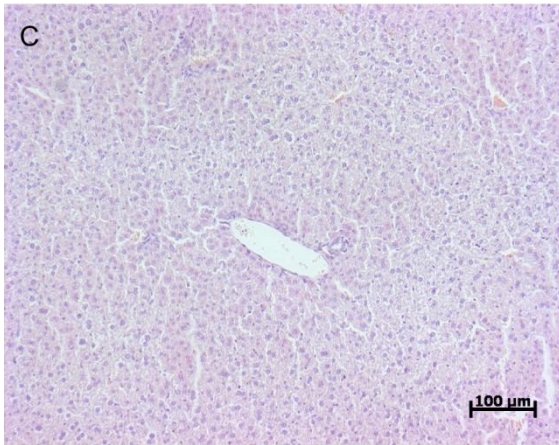
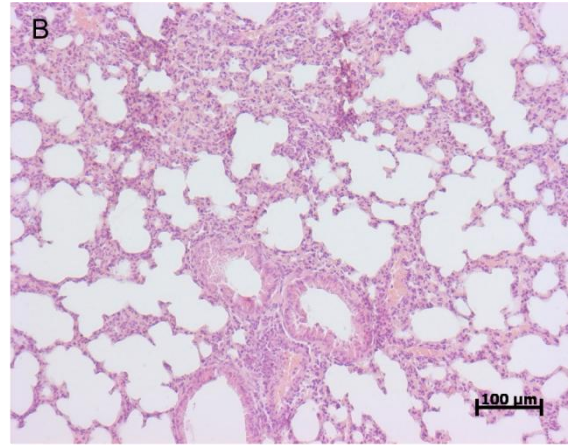
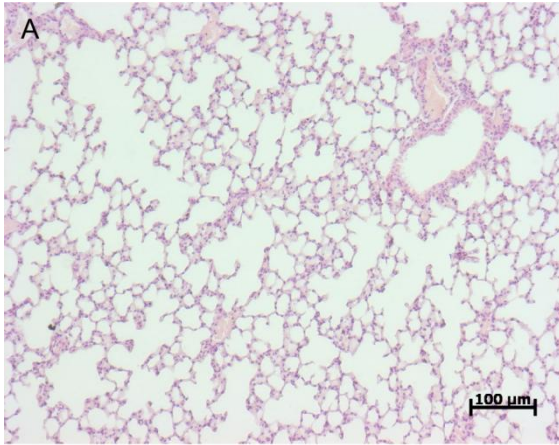


Figure 27 : Immunohistochimie dirigée contre les antigènes du virus Nipah sur des tissus de souris IFNAR KO infectées avec 5.10^4 ufp par voie i.p. (A) Cerveau. (B) Poumon. Marquage positif sur des pneumocytes de type I (flèche) et de type II (tête de flèche). (C) Foie. (D) Rate. Marquage positif dans les syncytia.

Figure 28 (ci-contre) : Comparaison histopathologique de différents tissus issus de souris IFNAR KO infectées (5.10^4 ufp i.p.) ou de souris IFNAR KO témoins. (A) Poumon sain. (B) Vascularite associée avec une forte inflammation pulmonaire. (C) Foie sain. (D) Foie présentant une forte vascularite et des zones de nécrose focale (flèches). (E) Rate saine avec architecture folliculaire normale. (F) Architecture folliculaire splénique perturbée. (G) Syncytia dans le foie. (H) Syncytia dans la rate.



C. A l'échelle moléculaire

Pour analyser la dissémination du virus au sein de l'organisme, nous avons collecté 5 organes au moment de l'autopsie : le cerveau, les poumons, le foie, les reins et la rate. L'ARN de ces échantillons a ensuite été extrait et la présence d'ARN viraux codant pour la protéine N a été déterminée par RT-qPCR (cf. Figure 29).

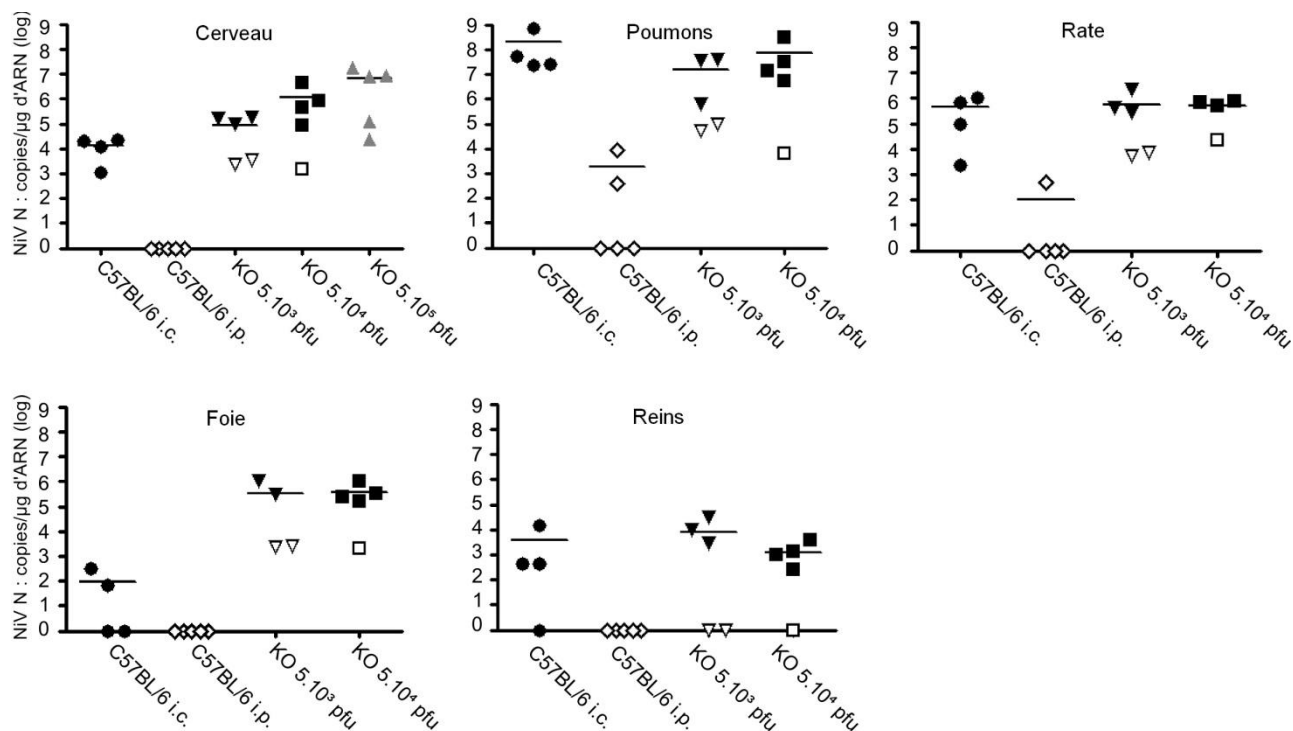


Figure 29 : Amplification des produits d'ARN spécifiques de la nucléocapside du virus Nipah par RT-qPCR. Les résultats, normalisés par le gène de ménage GAPDH, sont exprimés en copies/µg d'ARN récupéré à partir des échantillons. Les souris IFNAR KO ont toutes été inoculées par voie i.p. et seules les doses en ufp sont montrées. Toutes les souris C57BL/6 ont été inoculées à la dose de 5.10^5 ufp par voie i.p. ou i.c. Toutes les expériences de RT-qPCR ont été conduites en duplicat. Les symboles vides représentent les animaux qui ont survécus à l'infection et qui ont été euthanasiés à la fin du protocole (21 jours post inoculation). Les symboles en gris représentent les résultats d'une étude préliminaire où seuls les cerveaux avaient été récupérés pour analyse.

Le virus a été détecté dans tous les organes des souris IFNAR KO infectées par voie i.p. et le niveau d'expression de N semble être corrélé à la dose infectieuse utilisée. Pour les souris C57BL/6 infectées par voie i.c. on remarque que les résultats sont assez similaires aux souris IFNAR KO infectées par voie i.p. à l'exception du foie où les résultats sont beaucoup plus faibles. Par comparaison avec les souris IFNAR KO, les souris C57BL/6 infectées par voie

i.p. présentent un nombre de copies d'ARN vraiment très faible dans les poumons (seulement 2 échantillons faiblement positifs) et dans la rate (seulement 1 échantillon faiblement positif). Le seuil de détection n'est pas atteint pour tous les autres organes. On remarque aussi d'une façon générale que les animaux ayant survécu présentent une quantité plus faible d'ARN viral dans leurs organes que les animaux morts de la maladie.

D. Test de séroneutralisation

Les tests de séroneutralisation permettent d'évaluer la production d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus. Chez les souris C57BL/6, la production d'anticorps est nulle en cas d'injection par voie i.c. et reste très faible en cas d'injection du virus par voie i.p. Chez la souris IFNAR KO, les résultats diffèrent fortement selon la survie ou non de l'animal. Les animaux ayant survécu possèdent des anticorps avec un pouvoir séroneutralisant très élevé alors qu'il est très faible chez les animaux morts des suites de l'infection virale. Il est possible d'expliquer cette différence par le délai de production des anticorps. Néanmoins, le niveau d'anticorps neutralisant est faible chez les souris C57BL/6 infectées par voie i.p. bien qu'elles aient toutes survécu.

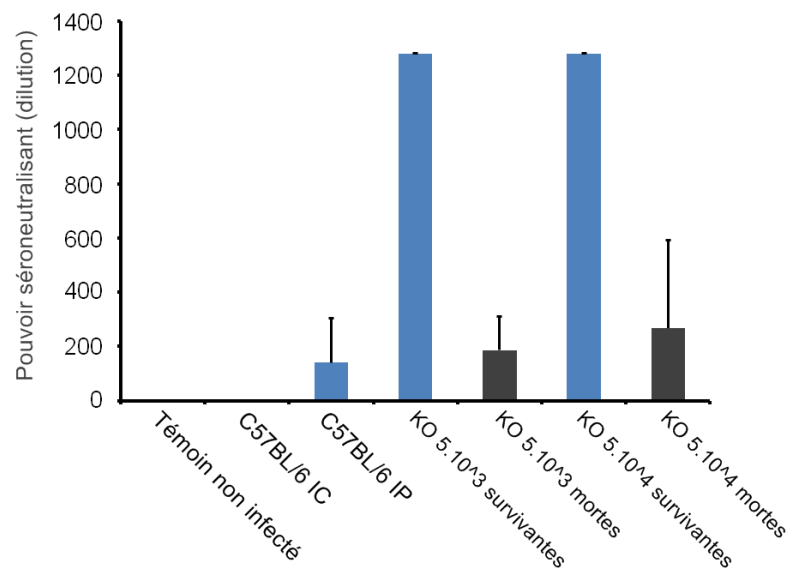


Figure 30 : Test de séroneutralisation contre le virus Nipah. En bleu, les groupes d'animaux ayant survécu. En gris, les groupes d'animaux morts des suites de l'infection.

V. Discussion

Les modèles animaux sont des éléments cruciaux pour améliorer la compréhension de la physiopathologie des infections virales et la mise à l'épreuve de nouvelles approches prophylactiques ou thérapeutiques. Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à caractériser un nouveau modèle rongeur pour l'étude du virus Nipah : des souris transgéniques déficientes pour le récepteur à l'interféron de type I (IFNAR KO). Ce nouveau modèle murin imite relativement bien la pathologie observée chez l'homme. Ainsi, grâce aux nombreux outils et connaissances disponibles chez la souris, ce modèle permettra d'élargir les opportunités de recherche quant à la compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu lors d'infection par le virus Nipah.

Les souris IFNAR KO infectées par le virus Nipah présentent des signes cliniques très similaires à ceux observés chez les humains et les autres modèles animaux validés. Les cas cliniques humains présentent principalement de la fièvre, une faiblesse généralisée, des facultés mentales altérées et des difficultés respiratoires [64]. Dans les étapes précoces de l'infection chez la souris IFNAR KO, nous avons observé des troubles comportementaux liés à la maladie tels que de l'agitation, de l'irritabilité ou encore un défaut de toilette qui suggère l'existence de fièvre. Au cours de la progression de la maladie, des signes de douleur associés à des troubles neurologiques sont apparus. Les souris présentaient un faciès douloureux tel que défini par le *Mouse Grimace Scale* [114] (yeux bridés, nez bombé, oreilles et moustaches en arrière), de la lordose, de l'agressivité et de la prostration. Chez l'homme, l'irritabilité [115], les maux de tête, les myalgies et la réduction de l'état de conscience [95] ont été des symptômes fréquemment observés et associés à de la douleur. Les symptômes neurologiques comme les troubles de la locomotion, un port de tête incliné ou la paralysie ont été notés chez d'autres modèles animaux et particulièrement chez le hamster doré [4]. Cependant, ce modèle apparaît comme moins sensible que le hamster chez qui la DL_{50} est située autour de 7 ufp [5]. Chez la souris IFNAR KO, la DL_{50} reste relativement élevée (autour de 1000 ufp) malgré l'absence de réponse interféron fonctionnelle.

Les études histopathologiques révèlent une vascularite généralisée, des hémorragies et une forte inflammation dans tous les organes. Ces éléments sont assez caractéristiques d'une infection par le virus Nipah et sont considérés comme des éléments du diagnostic de certitude chez l'homme [95]. Les lésions du système nerveux central chez la souris IFNAR KO

évoquent une méningo-encéphalite non suppurative telle que décrite chez l'homme et d'autres modèles animaux. Des cellules géantes multinucléées, portant le nom de syncytia, ont été repérées dans de nombreux organes et particulièrement dans les poumons, le foie, la rate et le cerveau. Le marquage immunohistochimique fait corrélérer la présence du virus avec celle de ces syncytia. Les lésions hépatiques semblent être une caractéristique propre à ce modèle et n'ont jamais été décrites ailleurs. Le système interféron joue généralement un rôle majeur dans la physiopathologie des infections du foie et de nombreuses études montrent que cet organe est l'un des producteurs majeurs d'interféron de type I [116,117]. Ceci suggère que, chez les souris possédant un système interféron fonctionnel, la réponse interféron du foie n'est pas dépassée par l'activité inhibitrice des protéines non structurales virales. Les mécanismes sous-jacents de cette résistance restent cependant à découvrir.

La période entre l'inoculation du virus et la survenue de la mort est relativement similaire à celle observée chez les autres modèles, allant de 6 à 9 jours par voie i.p. [118]. L'analyse du pouvoir neutralisant des anticorps apporte des données nouvelles sur les mécanismes de défense immunitaire mis en jeu suite à l'infection par le virus Nipah. Au sein des souris survivantes et euthanasiées à 21 jours post-inoculation, le pouvoir séroneutralisant est bien plus élevé chez les souris IFNAR KO que chez les souris C57BL/6. Ceci suggère que la présence d'interféron suffit pour stopper l'infection chez les souris de souches sauvages avant qu'une réponse séroneutralisante n'ait besoin d'être mise en place. Par ailleurs, la forte différence de séroneutralisation entre les souris IFNAR KO mortes au cours de l'infection et celles y ayant survécu mène à deux hypothèses pouvant se révéler complémentaires. Il apparaît probable que les souris qui sont mortes au cours de l'expérience n'ont pas eu le temps de synthétiser leur anticorps neutralisants. On ne sait pas cependant si la survie des autres souris est liée à une production massive d'anticorps neutralisants ou à une production plus précoce de ceux-ci. Il s'agit donc très certainement d'une course engagée entre le virus et le système immunitaire de son hôte dont l'issue détermine la survie de l'animal.

Dans des études précédentes, les souris ont été déclarées résistantes à l'infection par le virus Nipah [4]. Nous avons donc comparé l'infection de souris de souche sauvage C57BL/6 avec notre modèle IFNAR KO en utilisant différentes voies d'inoculation. Les résultats obtenus suggèrent très fortement que le système interféron est impliqué dans la

résistance des souris de souche sauvage à l'infection par le virus Nipah. En effet, aux mêmes doses d'inoculum viral et par la même voie d'inoculation, seules les souris IFNAR KO développent la maladie liée à l'infection. Cependant, si le virus est inoculé par voie intracrâniale aux souris de souche sauvage, celles-ci meurent en moins de 7 jours. Par comparaison avec les souris IFNAR KO inoculées i.c., la mort est significativement reportée dans les souris de souches sauvages. Cette observation est parfaitement légitime puisque la réponse interféron est une des défenses immunitaires majeures du cerveau. Toutes ces observations suggèrent que, quand le virus est inoculé par voie i.p., les souris de souche sauvage sont capables de stopper la progression du virus vers le cerveau alors que les souris IFNAR KO n'en sont pas capables. Une hypothèse envisageable serait simplement d'ordre cinétique. Lorsqu'elles sont inoculées par voie i.p., les souris C59BL/6 sont en mesure d'induire un état antiviral dans le cerveau par l'intermédiaire des sécrétions d'interféron de type I (comme cela a pu être montré pour le coronavirus de l'hépatite murine [117]). De plus, quand les souris sont inoculées par voie i.p., la barrière hémato-encéphalique (BHE) protège le cerveau. Lors d'inoculation par voie i.c., l'action de la BHE est totalement inefficace et le virus a alors le temps de se répliquer dans ce site immunoprivilégié qu'est le cerveau. Dans le cas d'une inoculation par voie i.c. et après une période d'incubation, le virus est capable de briser la BHE en détruisant son endothélium et de rejoindre la circulation générale pour se disséminer. Cette hypothèse explique notamment pourquoi la quantité d'ARN viral est si élevée dans les poumons (deuxième organe traversé par le flux veineux venant du cerveau) des souris C57BL/6 inoculée par voie i.c.

Par comparaison avec le large spectre de mammifères susceptibles, le système interféron des souris semble bien plus efficace dans son combat contre l'infection par le virus Nipah. Un parallèle avec les chauves-souris frugivores, qui contrôlent l'infection et excrètent occasionnellement le virus, peut être envisagé. L'inhibition de la réponse interféron intervient très certainement dans ce phénomène. En effet, les produits du gène P (à savoir les protéines P, V, W et C) sont capables d'interférer avec les cascades d'activation de la voie interféron. Les protéines V et W sont capables de bloquer l'activation des promoteurs dépendants de l'*interferon-regulatory-factor 3* (IRF-3) quand il est activé par de l'ARN double brin. La protéine V interfère aussi avec le récepteur cytosolique de reconnaissance des pathogène MDA5 [119] alors que la protéine W est capable de déstabiliser la forme activée de l'IRF-3 dans le noyau, ce qui inhibe la voie de signalisation du

Toll-Like-Receptor (TLR) 3 [38]. Les protéines P, V et W sont aussi capables de bloquer la signalisation JAK/STAT [29] qui utilise des membres de la famille des *Janus tyrosine Kinase* (JAK) et de la famille des *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT). Les protéines virales non structurales sont capables de capturer et de séquestrer les molécules STAT en complexes de haut poids moléculaire [120] qui annihilent leur activité inductrice de l'interféron. Des médicaments antiviraux connus pour potentialiser la réponse interféron (tels que la ribavirine) ont été essayés sans succès chez l'homme [121] et les modèles animaux [122]. Nous pensons que l'inhibition de la réponse interféron induite par le virus Nipah, étant à l'origine d'une réplication hautement productive et d'une pathogénie augmentée chez de nombreuses espèces, n'est pas fonctionnelle chez la souris. En revanche, les mécanismes fins à l'origine de la résistance des souris ne sont pas élucidés. L'adaptation évolutive peut fournir quelques éléments de réponse sur la résistance des souris à divers inhibiteurs viraux, comme c'est le cas pour la protéine kinase PKR [123] qui a évolué contre les protéines d'inhibition de certains poxvirus.

Enfin, le modèle murin IFNAR KO donne l'opportunité de travailler avec une quantité considérable de réactifs disponibles chez la souris. L'utilisation d'anticorps commerciaux permettra l'identification *in vivo* des cellules impliquées dans la formation des syncytia et la localisation tissulaire de cytokines telles que l'interféron λ ou CXCL10. En outre, la possibilité d'utiliser d'autres lignées de souris *knock-out* (et de les croiser entre elles) aidera à analyser dans le détail la réponse immunitaire (particulièrement en ce qui concerne le rôle des lymphocytes T cytotoxiques) et les voies de signalisation engagées. Le génome de la souris étant entièrement connu et largement annoté, l'utilisation des techniques de transcriptomique pourra être envisagée et apporter des informations très intéressantes sur l'interaction hôte-pathogène.

Conclusion

En conclusion, le virus Nipah représente un enjeu important pour les années à venir et la recherche sur ce virus doit nous permettre d'être prêt à faire face à ce fléau, aussi bien à la suite d'une pandémie internationale que d'une attaque bioterroriste. De nombreux vétérinaires sont impliqués sur ce sujet à travers le monde et travaillent en partenariat avec des médecins, des virologistes et des épidémiologistes pour faire avancer les connaissances sur ce virus.

L'avancée des savoirs passe, en virologie, par l'utilisation de modèles animaux fiables et exploitables aussi bien sur le plan clinique que microscopique et fonctionnel. La souris IFNAR KO représente donc un nouveau modèle prometteur dont l'utilisation permettra d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie du virus Nipah et les relations hôte-pathogène. Ce nouveau modèle murin possède aussi de nombreux avantages par rapport aux modèles animaux existants pour l'étude du virus Nipah. En effet, il fournit des animaux dont le fond génétique est contrôlé, dont la manipulation est facile et qui peuvent être utilisés avec un coût financier et éthique raisonnable. Enfin, l'utilisation de ce modèle est envisageable pour l'étude et la découverte de nouveaux traitements prophylactiques et thérapeutiques ainsi que pour le criblage de candidats médicaments et vaccins potentiels.

Bibliographie

1. Rockx B, Bossart KN, Feldmann F, Geisbert JB, Hickey AC, et al. (2010) A Novel Model of Lethal Hendra Virus Infection in African Green Monkeys and the Effectiveness of Ribavirin Treatment. *J Virol* 84: 9831–9839. doi:10.1128/JVI.01163-10.
2. Geisbert TW, Daddario-DiCaprio KM, Hickey AC, Smith MA, Chan Y-P, et al. (2010) Development of an Acute and Highly Pathogenic Nonhuman Primate Model of Nipah Virus Infection. *PLoS ONE* 5: e10690. doi:10.1371/journal.pone.0010690.
3. Marianneau P, Guillaume V, Wong T, Badmanathan M, Looi RY, et al. (2010) Experimental infection of squirrel monkeys with nipah virus. *Emerging Infect Dis* 16: 507–510.
4. Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M, et al. (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163: 2127–2137.
5. Yoneda M, Guillaume V, Ikeda F, Sakuma Y, Sato H, et al. (2006) Establishment of a Nipah virus rescue system. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 16508–16513. doi:10.1073/pnas.0606972103.
6. Bossart K (2008) Functional studies of host-specific ephrin-B ligands as Henipavirus receptors. *Virology* 372: 357–371. doi:10.1016/j.virol.2007.11.011.
7. Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PSK, et al. (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *The Lancet* 354: 1257–1259. doi:10.1016/S0140-6736(99)04299-3.
8. Outbreak of Hendra-like virus—Malaysia and Singapore, 1998–1999 (1999). *M or Mortal Wkly Rep* 13: 265–269.
9. Mohd Nor MN, Gan CH, Ong BL (2000) Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev - Off Int Epizoot* 19: 160–165.
10. Farrar JJ (1999) Nipah-virus encephalitis—investigation of a new infection. *The Lancet* 354: 1222–1223. doi:10.1016/S0140-6736(99)90124-1.
11. Paton NI, Leo YS, Zaki SR, Auchus AP, Lee KE, et al. (1999) Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *The Lancet* 354: 1253–1256. doi:10.1016/S0140-6736(99)04379-2.
12. Lam S-K (2003) Nipah virus—a potential agent of bioterrorism? *Antiviral Res* 57: 113–119.
13. Chua KB (2003) Nipah virus outbreak in Malaysia. *Journal of Clinical Virology* 26: 265–275. doi:10.1016/S1386-6532(02)00268-8.
14. Harit AK, Ichhpujani RL, Gupta S, Gill KS, Lal S, et al. (2006) Nipah/Hendra virus outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001. *Indian J Med Res* 123: 553–560.

15. Hsu VP, Hossain MJ, Parashar UD, Ali MM, Ksiazek TG, et al. (2004) Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerging Infect Dis* 10: 2082–2087.
16. Stone R (2011) Breaking the Chain in Bangladesh. *Science* 331: 1128–1131. doi:10.1126/science.331.6021.1128.
17. ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release (n.d.). Available:<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>. Accessed 5 November 2011.
18. Mayo MA (2002) Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* 147: 1071–1076. doi:10.1007/s007050200036.
19. Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, et al. (2000) Molecular Characterization of Nipah Virus, a Newly Emergent Paramyxovirus. *Virology* 271: 334–349. doi:10.1006/viro.2000.0340.
20. Harcourt BH, Tamin A, Halpin K, Ksiazek TG, Rollin PE, et al. (2001) Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus. *Virology* 287: 192–201. doi:10.1006/viro.2001.1026.
21. Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang L-F (2006) Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nat Rev Micro* 4: 23–35. doi:10.1038/nrmicro1323.
22. Chow VTK, Tambyah PA, Yeo WM, Phoon MC, Howe J (2000) Diagnosis of Nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology* 19: 143–147. doi:10.1016/S1386-6532(00)00094-9.
23. Halpin K, Young PL, Field HE, Mackenzie JS (2000) Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology* 81: 1927–1932.
24. Hyatt AD, Zaki SR, Goldsmith CS, Wise TG, Hengstberger SG (2001) Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect* 3: 297–306.
25. Ong ST, Yusoff K, Kho CL, Abdullah JO, Tan WS (2009) Mutagenesis of the nucleocapsid protein of Nipah virus involved in capsid assembly. *J Gen Virol* 90: 392–397. doi:10.1099/vir.0.005710-0.
26. Omi-Furutani M, Yoneda M, Fujita K, Ikeda F, Kai C (2010) Novel Phosphoprotein-Interacting Region in Nipah Virus Nucleocapsid Protein and Its Involvement in Viral Replication. *J Virol* 84: 9793–9799. doi:10.1128/JVI.00339-10.
27. Fields B (2007) *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. p.
28. Wang L-F, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, et al. (2001) Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes and Infection* 3: 279–287. doi:10.1016/S1286-4579(01)01381-8.

29. Shaw ML, Garcia-Sastre A, Palese P, Basler CF (2004) Nipah Virus V and W Proteins Have a Common STAT1-Binding Domain yet Inhibit STAT1 Activation from the Cytoplasmic and Nuclear Compartments, Respectively. *J Virol* 78: 5633–5641. doi:10.1128/JVI.78.11.5633-5641.2004.
30. Wang YE, Park A, Lake M, Pentecost M, Torres B, et al. (2010) Ubiquitin-Regulated Nuclear-Cytoplasmic Trafficking of the Nipah Virus Matrix Protein Is Important for Viral Budding. *PLoS Pathog* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1001186.
31. Pager CT, Craft WW Jr, Patch J, Dutch RE (2006) A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* 346: 251–257. doi:10.1016/j.virol.2006.01.007.
32. Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, et al. (2005) EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* 436: 401–405. doi:10.1038/nature03838.
33. Negrete OA, Wolf MC, Aguilar HC, Enterlein S, Wang W, et al. (2006) Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog* 2: e7. doi:10.1371/journal.ppat.0020007.
34. Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot M-C, et al. (2010) The Nonstructural Proteins of Nipah Virus Play a Key Role in Pathogenicity in Experimentally Infected Animals. *PLoS ONE* 5: e12709. doi:10.1371/journal.pone.0012709.
35. Park M-S, Shaw ML, Muñoz-Jordan J, Cros JF, Nakaya T, et al. (2003) Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol* 77: 1501–1511.
36. Yokota S-I, Okabayashi T, Fujii N (2011) Measles virus C protein suppresses gamma-activated factor formation and virus-induced cell growth arrest. *Virology* 414: 74–82. doi:10.1016/j.virol.2011.03.010.
37. McAllister CS, Toth AM, Zhang P, Devaux P, Cattaneo R, et al. (2010) Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus. *J Virol* 84: 380–386. doi:10.1128/JVI.02630-08.
38. Shaw ML, Cardenas WB, Zamarin D, Palese P, Basler CF (2005) Nuclear Localization of the Nipah Virus W Protein Allows for Inhibition of both Virus- and Toll-Like Receptor 3-Triggered Signaling Pathways. *J Virol* 79: 6078–6088. doi:10.1128/JVI.79.10.6078-6088.2005
39. Ciancanelli MJ, Volchkova VA, Shaw ML, Volchkov VE, Basler CF (2009) Nipah Virus Sequesters Inactive STAT1 in the Nucleus via a P Gene-Encoded Mechanism. *J Virol* 83: 7828–7841. doi:10.1128/JVI.02610-08.
40. Lee B, Ataman ZA (2011) Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. *Trends in Microbiology* 19: 389–399. doi:10.1016/j.tim.2011.03.005.

41. Mathieu C, Pohl C, Szecsi J, Trajkovic-Bodennec S, Devergnas S, et al. (2011) Nipah Virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. *Journal of Virology* 18. Available:<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00549-11>. Accessed 19 May 2011.
42. Weingartl H, Czub S, Copps J, Berhane Y, Middleton D, et al. (2005) Invasion of the Central Nervous System in a Porcine Host by Nipah Virus. *J Virol* 79: 7528–7534. doi:10.1128/JVI.79.12.7528-7534.2005
43. Zimmer M, Palmer A, Köhler J, Klein R (2003) EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5: 869–878. doi:10.1038/ncb1045.
44. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998) Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93: 741–753.
45. Pfaff D, Héroult M, Riedel M, Reiss Y, Kirmse R, et al. (2008) Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *J Cell Sci* 121: 3842–3850. doi:10.1242/jcs.030627.
46. Gerlier D (2011) Emerging zoonotic viruses: new lessons on receptor and entry mechanisms. *Current Opinion in Virology* 1: 27–34. doi:10.1016/j.coviro.2011.05.014.
47. The Human Protein Atlas (n.d.). Available:<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000125266>. Accessed 25 August 2011.
48. Young PL, Halpin K, Selleck PW, Field H, Gravel JL, et al. (1996) Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg Infect Dis* 2: 239–240.
49. Enserink M (2000) Emerging diseases. Malaysian researchers trace Nipah virus outbreak to bats. *Science* 289: 518–519.
50. Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, et al. (2001) Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* 7: 439–441.
51. Wacharapluesadee S, Boongird K, Wanghongsa S, Ratanasetyuth N, Supavonwong P, et al. (2010) A longitudinal study of the prevalence of Nipah virus in *Pteropus lylei* bats in Thailand: evidence for seasonal preference in disease transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 183–190. doi:10.1089/vbz.2008.0105.
52. Epstein JH, Prakash V, Smith CS, Daszak P, McLaughlin AB, et al. (2008) Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India. *Emerging Infect Dis* 14: 1309–1311.
53. Reynes J-M, Counor D, Ong S, Faure C, Seng V, et al. (2005) Nipah virus in Lyle’s flying foxes, Cambodia. *Emerging Infect Dis* 11: 1042–1047.

54. Pulliam JRC, Epstein JH, Dushoff J, Rahman SA, Bunning M, et al. (2011) Agricultural intensification, priming for persistence and the emergence of Nipah virus: a lethal bat-borne zoonosis. *J R Soc Interface*.
55. Middleton DJ, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, et al. (2007) Experimental Nipah Virus Infection in Pteropid Bats (*Pteropus poliocephalus*). *Journal of Comparative Pathology* 136: 266–272. doi:16/j.jcpa.2007.03.002.
56. Hall L (2000) *Flying foxes : fruit and blossom bats of Australia*. Sydney: UNSW Press. p.
57. Williamson MM, Hooper PT, Selleck PW, Westbury HA, Slocombe RF (2000) Experimental hendra virus infection in pregnant guinea-pigs and fruit Bats (*Pteropus poliocephalus*). *J Comp Pathol* 122: 201–207. doi:10.1053/jcpa.1999.0364.
58. Middleton DJ, Westbury HA, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, et al. (2002) Experimental Nipah Virus Infection in Pigs and Cats. *Journal of Comparative Pathology* 126: 124–136. doi:10.1053/jcpa.2001.0532.
59. Field H, Young P, Yob JM, Mills J, Hall L, et al. (2001) The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes and Infection* 3: 307–314. doi:10.1016/S1286-4579(01)01384-3.
60. Goh KJ, Tan CT, Chew NK, Tan PS, Kamarulzaman A, et al. (2000) Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* 342: 1229–1235. doi:10.1056/NEJM200004273421701.
61. Chong HT, Kunjapan SR, Thayaparan T, Tong J, Petharunam V, et al. (2002) Nipah encephalitis outbreak in Malaysia, clinical features in patients from Seremban. *Can J Neurol Sci* 29: 83–87.
62. Tan CT, Wong KT (2003) Nipah encephalitis outbreak in Malaysia. *Ann Acad Med Singap* 32: 112–117.
63. Chong HT, Hossain MJ, Tan CT (2008) Differences in epidemiologic and clinical features of Nipah virus encephalitis between the Malaysian and Bangladesh outbreaks. *Neurology Asia*: 23–26.
64. Hossain MJ, Gurley ES, Montgomery JM, Bell M, Carroll DS, et al. (2008) Clinical Presentation of Nipah Virus Infection in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases* 46: 977–984. doi:10.1086/529147.
65. Sejvar JJ, Hossain J, Saha SK, Gurley ES, Banu S, et al. (2007) Long-term neurological and functional outcome in Nipah virus infection. *Ann Neurol* 62: 235–242. doi:10.1002/ana.21178.
66. Mills JN, Alim ANM, Bunning ML, Lee OB, Wagoner KD, et al. (2009) Nipah virus infection in dogs, Malaysia, 1999. *Emerging Infect Dis* 15: 950–952.
67. Hooper P, Zaki S, Daniels P, Middleton D (2001) Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* 3: 315–322.

68. Epstein JH, Abdul Rahman S, Zambriski JA, Halpin K, Meehan G, et al. (2006) Feral cats and risk for Nipah virus transmission. *Emerging Infect Dis* 12: 1178–1179.
69. Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Bingham J, Halpin K, et al. (2006) Feline Model of Acute Nipah Virus Infection and Protection with a Soluble Glycoprotein-Based Subunit Vaccine. *J Virol* 80: 12293–12302. doi:10.1128/JVI.01619-06.
70. Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Halpin K, Bingham J, et al. (2007) Vertical Transmission and Fetal Replication of Nipah Virus in an Experimentally Infected Cat. *Journal of Infectious Diseases* 196: 812–816. doi:10.1086/520818.
71. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, et al. (2000) Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. *Science* 288: 1432–1435. doi:10.1126/science.288.5470.1432.
72. Wigmore Hall finally cleared of deadly virus (n.d.). Available: <http://www.turfclub.com.sg/DesktopModules/AdvancedArticles/ArticleDetail.aspx?ItemId=8020&ModuleId=1138&TabId=85&PortalId=0>. Accessed 29 July 2011.
73. Luby SP, Gurley ES, Hossain MJ (2009) Transmission of human infection with Nipah Virus. *Clin Infect Dis* 49: 1743–1748. doi:10.1086/647951.
74. Weingartl HM, Berhane Y, Czub M (2009) Animal models of henipavirus infection: A review. *The Veterinary Journal* 181: 211–220. doi:10.1016/j.tvjl.2008.10.016.
75. Torres-Velez FJ, Shieh W-J, Rollin PE, Morken T, Brown C, et al. (2008) Histopathologic and immunohistochemical characterization of Nipah virus infection in the guinea pig. *Vet Pathol* 45: 576–585. doi:10.1354/vp.45-4-576.
76. Bossart KN, Zhu Z, Middleton D, Klippel J, Crameri G, et al. (2009) A Neutralizing Human Monoclonal Antibody Protects against Lethal Disease in a New Ferret Model of Acute Nipah Virus Infection. *PLoS Pathog* 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000642.
77. Tanimura N, Imada T, Kashiwazaki Y, Sharifah SH (2006) Distribution of viral antigens and development of lesions in chicken embryos inoculated with nipah virus. *J Comp Pathol* 135: 74–82. doi:10.1016/j.jcpa.2006.05.001.
78. Hayman DTS, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, et al. (2008) Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *PLoS ONE* 3: e2739. doi:10.1371/journal.pone.0002739.
79. Iehlé C, Razafitrimo G, Razainirina J, Andriaholinirina N, Goodman SM, et al. (2007) Henipavirus and Tioman virus antibodies in pteropodid bats, Madagascar. *Emerging Infect Dis* 13: 159–161.
80. Chew MH, Arguin PM, Shay DK, Goh KT, Rollin PE, et al. (2000) Risk factors for Nipah virus infection among abattoir workers in Singapore. *J Infect Dis* 181: 1760–1763. doi:10.1086/315443.

81. Sahani M, Parashar UD, Ali R, Das P, Lye MS, et al. (2001) Nipah virus infection among abattoir workers in Malaysia, 1998-1999. *Int J Epidemiol* 30: 1017–1020.
82. Ali R, Mounts AW, Parashar UD, Sahani M, Lye MS, et al. (2001) Nipah virus among military personnel involved in pig culling during an outbreak of encephalitis in Malaysia, 1998-1999. *Emerging Infect Dis* 7: 759–761.
83. Chadha MS, Comer JA, Lowe L, Rota PA, Rollin PE, et al. (2006) Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerging Infect Dis* 12: 235–240.
84. Montgomery JM, Hossain MJ, Gurley E, Carroll DS, Croisier A, et al. (2008) Risk Factors for Nipah Virus Encephalitis in Bangladesh. *Emerg Infect Dis* 14: 1526–1532. doi:10.3201/eid1410.060507.
85. Homaira N, Rahman M, Hossain MJ, Epstein JH, Sultana R, et al. (2010) Nipah virus outbreak with person-to-person transmission in a district of Bangladesh, 2007. *Epidemiol Infect* 138: 1630–1636. doi:10.1017/S0950268810000695.
86. Blum LS, Khan R, Nahar N, Breiman RF (2009) In-depth assessment of an outbreak of Nipah encephalitis with person-to-person transmission in Bangladesh: implications for prevention and control strategies. *Am J Trop Med Hyg* 80: 96–102.
87. Gurley ES, Montgomery JM, Hossain MJ, Bell M, Azad AK, et al. (2007) Person-to-Person Transmission of Nipah Virus in a Bangladeshi Community. *Emerg Infect Dis* 13: 1031–1037. doi:10.3201/eid1307.061128.
88. Luby SP, Rahman M, Hossain MJ, Blum LS, Husain MM, et al. (2006) Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerging Infect Dis* 12: 1888–1894.
89. Luby SP, Gurley ES, Hossain MJ (2009) Transmission of Human Infection with Nipah Virus. *CLIN INFECT DIS* 49: 1743–1748. doi:10.1086/647951.
90. Nahar N, Sultana R, Gurley ES, Hossain MJ, Luby SP (2010) Date Palm Sap Collection: Exploring Opportunities to Prevent Nipah Transmission. *EcoHealth* 7: 196–203. doi:10.1007/s10393-010-0320-3.
91. Salah Uddin Khan M, Hossain J, Gurley ES, Nahar N, Sultana R, et al. (2011) Use of Infrared Camera to Understand Bats' Access to Date Palm Sap: Implications for Preventing Nipah Virus Transmission. *Ecohealth*.
92. Tan CT, Goh KJ, Wong KT, Sarji SA, Chua KB, et al. (2002) Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol* 51: 703–708. doi:10.1002/ana.10212.
93. Human Development Reports (HDR) – United Nations Development Programme (UNDP) (n.d.). Available: <http://hdr.undp.org/en/>. Accessed 31 July 2011.
94. Sarji SA, Abdullah BJ, Goh KJ, Tan CT, Wong KT (2000) MR imaging features of Nipah encephalitis. *AJR Am J Roentgenol* 175: 437–442.

95. Wong KT, Shieh W-J, Kumar S, Norain K, Abdullah W, et al. (2002) Nipah Virus Infection. *Am J Pathol* 161: 2153–2167.
96. Organisation mondiale de la santé animale.;Organisation mondiale de la santé animale. (2008) *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals : mammals, birds, and bees*. 6th ed. Paris: OIE. 1344-1355 p.
97. Jr DGM (2011) Bangladesh Bans Sale of Palm Sap After an Unusually Lethal Oubreak. *The New York Times*.
Available:<http://www.nytimes.com/2011/03/22/health/22global.html?partner=rss&mc=rss>. Accessed 22 March 2011.
98. Chua KB (2010) Risk factors, prevention and communication strategy during Nipah virus outbreak in Malaysia. *Malays J Pathol* 32: 75–80.
99. Guillaume V, Contamin H, Loth P, Georges-Courbot M-C, Lefevre A, et al. (2004) Nipah Virus: Vaccination and Passive Protection Studies in a Hamster Model. *J Virol* 78: 834–840. doi:10.1128/JVI.78.2.834-840.2004
100. Walpita P, Barr J, Sherman M, Basler CF, Wang L (2011) Vaccine Potential of Nipah Virus-Like Particles. *PLoS ONE* 6: e18437. doi:10.1371/journal.pone.0018437.
101. Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet J-C, et al. (2006) Recombinant Nipah Virus Vaccines Protect Pigs against Challenge. *J Virol* 80: 7929–7938. doi:10.1128/JVI.00263-06.
102. Porotto M, Rockx B, Yokoyama CC, Talekar A, DeVito I, et al. (2010) Inhibition of Nipah Virus Infection In Vivo: Targeting an Early Stage of Paramyxovirus Fusion Activation during Viral Entry. *PLoS Pathog* 6. doi:10.1371/journal.ppat.1001168.
103. Porotto M, Yi F, Moscona A, LaVan DA (2011) Synthetic Protocells Interact with Viral Nanomachinery and Inactivate Pathogenic Human Virus. *PLoS ONE* 6: e16874. doi:10.1371/journal.pone.0016874.
104. Organisation mondiale de la santé (2005) *Manuel de sécurité biologique en laboratoire*. 3rd ed. Genève. p.
105. Harcourt BH, Lowe L, Tamin A, Liu X, Bankamp B, et al. (2005) Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. *Emerging Infect Dis* 11: 1594–1597.
106. Hosono H, Kono H, Ito S, Shirai J (2006) T6-1.3.1 - Economic impact of nipah virus infection outbreak in Malaysia. *ISV ISVEE 11: Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Cairns, Australia: 324.
107. Lee B (2007) Envelope-receptor interactions in Nipah virus pathobiology. *Ann N Y Acad Sci* 1102: 51–65. doi:10.1196/annals.1408.004.

108. Center for Disease Control (CDC) (n.d.). Available:<http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#c>. Accessed 6 April 2011.
109. van den Broek MF, Müller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 148: 5–18.
110. Bray M (2001) The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. *J Gen Virol* 82: 1365–1373. doi:[10.1099/jgv.2001.82.1365](https://doi.org/10.1099/jgv.2001.82.1365).
111. Detje CN, Meyer T, Schmidt H, Kreuz D, Rose JK, et al. (2009) Local Type I IFN Receptor Signaling Protects against Virus Spread within the Central Nervous System. *The Journal of Immunology* 182: 2297–2304. doi:[10.4049/jimmunol.0800596](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800596).
112. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45. doi:[10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45).
113. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, et al. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55: 611–622. doi:[10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797).
114. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, et al. (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Meth* 7: 447–449. doi:[10.1038/nmeth.1455](https://doi.org/10.1038/nmeth.1455).
115. Siva SR, Chong HT, Tan CT (2009) Ten year clinical and serological outcomes of Nipah virus infection. *Neurol Asia* 14: 53–58.
116. Pulverer JE, Rand U, Lienenklaus S, Kugel D, Zietara N, et al. (2010) Temporal and Spatial Resolution of Type I and III Interferon Responses In Vivo. *J Virol* 84: 8626–8638. doi:[10.1128/JVI.00303-10](https://doi.org/10.1128/JVI.00303-10).
117. Sommereyns C, Paul S, Staeheli P, Michiels T (2008) IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. *PLoS Pathog* 4: e1000017. doi:[10.1371/journal.ppat.1000017](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000017).
118. Williamson MM, Torres-Velez FJ (2010) Henipavirus: a review of laboratory animal pathology. *Vet Pathol* 47: 871–880. doi:[10.1177/0300985810378648](https://doi.org/10.1177/0300985810378648).
119. Ramachandran A, Horvath CM (2010) Dissociation of Paramyxovirus Interferon Evasion Activities: Universal and Virus-Specific Requirements for Conserved V Protein Amino Acids in MDA5 Interference. *J Virol* 84: 11152–11163. doi:[10.1128/JVI.01375-10](https://doi.org/10.1128/JVI.01375-10).
120. Rodriguez JJ, Parisien J-P, Horvath CM (2002) Nipah Virus V Protein Evades Alpha and Gamma Interferons by Preventing STAT1 and STAT2 Activation and Nuclear Accumulation. *J Virol* 76: 11476–11483. doi:[10.1128/JVI.76.22.11476-11483.2002](https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11476-11483.2002).

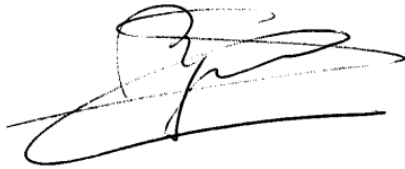
121. Chong HT, Kamarulzaman A, Tan CT, Goh KJ, Thayaparan T, et al. (2001) Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Ann Neurol* 49: 810–813.
122. Freiberg AN, Worthy MN, Lee B, Holbrook MR (2010) Combined chloroquine and ribavirin treatment does not prevent death in a hamster model of Nipah and Hendra virus infection. *J Gen Virol* 91: 765–772. doi:10.1099/vir.0.017269-0.
123. Rothenburg S, Seo EJ, Gibbs JS, Dever TE, Dittmar K (2009) Rapid evolution of protein kinase PKR alters sensitivity to viral inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* 16: 63–70. doi:10.1038/nsmb.1529.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Stéphane BERTAGNOLI**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Kévin DHONDT** intitulée « *Mise en place d'un nouveau modèle animal pour l'étude de la pathogénèse du virus Nipah* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 15 Novembre 2011
Docteur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER

8 NOV. 2011



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Auteur : DHONDT, Kévin, Pierre, Louis

MISE EN PLACE D'UN NOUVEAU MODELE ANIMAL POUR L'ETUDE DE LA PATHOGENESE DU VIRUS NIPAH

Résumé

Le virus Nipah (NiV) est un paramyxovirus zoonotique émergent hautement pathogène. Il est capable d'infecter un large spectre d'hôtes incluant notamment la chauve-souris frugivore (réservoir naturel), le porc et l'homme. Bien que les récepteurs cellulaires au virus (EFN B2 et B3) soient fonctionnels chez la souris, celle-ci est résistante à l'infection par voie intrapéritonéale. Nous avons analysé la susceptibilité au NiV de souris transgéniques privées de leur récepteur à l'interféron de type I (IFNAR KO). L'ARN viral est détectable dans tous les organes analysés. L'infection est associée au développement d'une encéphalite fatale aux caractéristiques immunohistologiques similaires à celles observées chez l'homme. Ces résultats permettent donc d'envisager les souris IFNAR KO comme un nouveau modèle animal pour l'étude de la pathogénèse du NiV. Enfin, cette étude suggère que le système interféron de type I joue un rôle crucial dans la limitation de la propagation virale vers le cerveau.

Mots clés

Zoonose, virus, Nipah, paramyxovirus, émergent, souris, transgénique, modèle animal, interféron, histologie

DEVELOPPING A NEW ANIMAL MODEL TO STUDY NIPAH VIRUS PATHOGENESIS

Abstract

Nipah Virus (NiV) is a lethal zoonotic paramyxovirus emerged in 1998, which infects a wide range of mammals from its natural host, fruit bats, to humans. Although murine EFN B2 and B3 act as functional receptor for NiV, mice are resistant to intraperitoneal NiV inoculation. We analyzed here the susceptibility of mice deleted for the interferon type I receptor (IFNAR-KO) to NiV infection. Viral RNA was found in all analyzed organs and infection was associated with the development of fatal encephalitis, with immunohistochemical features similar to what was found in humans. Altogether, these results reveal IFNAR-KO mice as a new small animal model to study NiV pathogenesis and suggest the critical role of Interferon type I system in blocking the viral propagation from the periphery to the brain, preventing thus the lethal outcome of the infection.

Key words

Zoonosis, virus, Nipah, paramyxovirus, emerging, mouse, transgenic, animal model, interferon, histology