



HAL
open science

Détection qualitative et quantitative du virus de la fièvre de la vallée du Rift par PCR en temps réel : application à l'évaluation de l'efficacité de substances antivirales

Stephan Garcia

► To cite this version:

Stephan Garcia. Détection qualitative et quantitative du virus de la fièvre de la vallée du Rift par PCR en temps réel : application à l'évaluation de l'efficacité de substances antivirales. Sciences pharmaceutiques. 2001. dumas-01411211

HAL Id: dumas-01411211

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01411211>

Submitted on 7 Dec 2016

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

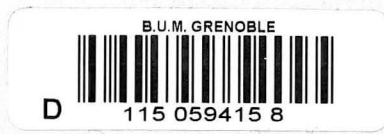
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2^e exemplaire



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNEE : 2001

N° D'ORDRE 7061

DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DU VIRUS DE LA FIEVRE
DE LA VALLEE DU RIFT PAR PCR EN TEMPS REEL
APPLICATION A L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DE SUBSTANCES
ANTIVIRALES

THESE
PRESENTEE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

STEPHAN GARCIA

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Devant le JURY compose de

Président du jury : M. le Professeur E. Drouet

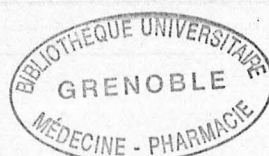
MEMBRES :

Mme le Docteur M. BOULOY

M. le Docteur J. M. CRANCE

M. le Docteur D. GARIN

M. le Professeur J. M. SEIGNEURIN



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

ANNEE : 2001

N° D'ORDRE

DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DU VIRUS DE LA FIEVRE
DE LA VALLEE DU RIFT PAR PCR EN TEMPS REEL
APPLICATION A L'EVALUATION DE L'EFFICACITE DE SUBSTANCES
ANTIVIRALES

THESE
PRESENTEE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

STEPHAN GARCIA

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Devant le JURY compose de

Président du jury : M. le Professeur E. Drouet

MEMBRES :

Mme le Docteur M. BOULOY

M. le Docteur J. M. CRANCE

M. le Docteur D. GARIN

M. le Professeur J. M. SEIGNEURIN



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe de l'unité de virologie du CRSSA qui m'a accueillie pour le stage au cours duquel ce travail a été réalisé :

- Daniel Garin et Jean-Marc Crance pour leur confiance et leur soutien.
- Coco, les deux Stephan, Tatie, Henri, Jojo, Jean-Phi, Audrey, Marie-Ange, Caroline Noël et Raph avec qui j'ai passé deux années très agréables et qui ont supporté mes sauts d'humeur.
- Emmanuel Drouet qui m'a donné le goût de la recherche et qui m'a soutenu dans mes démarches pour le DEA.
- Une mention spéciale pour Raphaël Germi pour sa franchise douloureuse pour l'ego mais tellement salvatrice...
- Je remercie également mes parents, mon frère et cécile pour leur patience et leur soutien indéfectible.

TABLE DES MATIERES

I PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1. HISTORIQUE-EPIDÉMIOLOGIE	6
2. CYCLE VIRAL. FACTEURS D'ÉMERGENCE	12
2.2. CYCLE VIRAL.....	12
2.3. FACTEURS D'ÉMERGENCE ET D'EXTENSION.....	13
3. CLINIQUE	22
3.1. DÉFINITION CLINIQUE DE LA MALADIE	22
3.2. PROPHYLAXIE ET TRAITEMENT.....	24
3.2.1. <i>Prophylaxie</i>	24
3.2.2. <i>Traitement</i>	29
4. ORGANISATION GÉNOMIQUE ET RÉPLICATION. PHYLOGÉNIE	31
4.1. ORGANISATION GÉNOMIQUE	32
4.1.1. <i>Le brin S</i>	32
4.1.2. <i>Le brin M</i>	35
4.1.3. <i>Le brin L</i>	35
4.2. LES ÉTAPES DE LA RÉPLICATION.....	36
4.3. PHYLOGÉNIE	40
II PARTIE EXPERIMENTALE	43
1. MATÉRIELS	43
1.1. VIRUS.....	43
1.2. CELLULES.....	43
1.3. SUBSTANCES ANTIVIRALES	43
1.4. SÉRUMS DE SOURIS.....	44

1.5.SÉRUMS HUMAINS	44
2. MÉTHODES	45
2.1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR L'UTILISATION DU RVFV .	45
2.2. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE ET DE LA CYTOTOXICITÉ DES SUBSTANCES CHOISIES.....	45
2.3. MESURE DE LA RÉDUCTION DES TITRES INFECTIEUX VIRAUX	46
2.4. EXTRACTION DES ARN VIRAUX.....	47
2.4.1. <i>Extraction des échantillons cellulaires</i>	47
2.4.2. <i>Extraction des sérums animaux</i>	47
2.4.3. <i>Extraction des sérums humains</i>	48
2.5. AMPLIFICATION GÉNIQUE DES ARN EXTRAITS.....	48
2.5.1. <i>Choix de la zone d'amplification</i>	48
2.5.2. <i>Choix des amorces d'amplification</i>	49
2.5.3. <i>Choix des conditions expérimentales de la transcription inverse</i>	49
2.5.4. <i>Choix des conditions de PCR</i>	50
2.6. CHOIX D'UN STANDARD DE QUANTIFICATION.....	55
2.6.1. <i>Construction du plasmide</i>	56
2.6.2. <i>Transcription de l'ARN plasmidique</i>	57
2.7. ÉVALUATION DU POTENTIEL D'UTILISATION DIAGNOSTIQUE DE LA RT-PCR EN TEMPS RÉEL	59
3. RÉSULTATS	60
3.1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES POUR L'UTILISATION DU RVFV .	60
3.2. ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE ET DE LA CYTOTOXICITÉ DES SUBSTANCES CHOISIES.....	60
3.4. RÉDUCTION DU TITRE INFECTIEUX SOUS L'EFFET DES SUBSTANCES ANTIVIRALES.....	61

3.5. QUANTIFICATION EN TEMPS RÉEL.....	63
3.5.1. <i>Choix du couple d'amplification</i>	63
3.5.2. <i>Choix d'une sonde d'hydrolyse</i>	64
3.5.3. <i>Optimisation de la RT-PCR en temps réel</i>	65
3.6. QUANTIFICATION DES ÉCHANTILLONS TRAITÉS. COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE DE RÉFÉRENCE.....	68
3.7. EVALUATION DU POTENTIEL D'UTILISATION DIAGNOSTIQUE DE LA RT-PCR EN TEMPS RÉEL	71
3.7.1. <i>Sérums animaux</i>	71
3.7.2. <i>Sérums humains</i>	72
4. DISCUSSION ET CONCLUSION	73
5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77.
ANNEXE	91

I PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Historique-Epidémiologie

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV), est un arbovirus du genre *Phlebovirus* (famille des *Bunyaviridae*), genre qui regroupe également d'autres virus pathogènes pour l'homme comme le virus de la fièvre à phlébotome (Sandfly Sicilian Virus) et le virus Toscana. Décrit dès 1913 lors d'épizooties ovines, il a été caractérisé et identifié en 1931 au nord du lac Naisha dans la Vallée du Rift kenyane [16]. A cette époque, les chercheurs ont pu montrer que la maladie affectait uniquement les animaux laissés à l'extérieur pendant la nuit et pas ceux protégés par des moustiquaires et ils ont également démontré qu'elle pouvait être transmise à un mouton sain par injection de sang, de plasma ou de broyat de foie provenant d'un animal infecté. Cependant, le virus a d'abord essentiellement été décrit comme un agent abortif chez les ovins, bovins et caprins et responsable d'hépatite chez différentes espèces animales (tableau I).

La transmission à l'homme a été rapidement suspectée à cause de l'observation d'un syndrome grippal affectant les bergers au contact des animaux malades, sans qu'un mode de transmission soit clairement identifié. En 1948, Smithburn a montré que l'agent responsable était transmis aux moutons par piqûre de moustique, ce qui a permis de rattacher l'infection aux arboviroses, qui regroupent l'ensemble des infections provoquées par des virus véhiculés par des moustiques (arbovirus, en anglais, « arthropod-borne viruses ») [92]. En parallèle, au cours des vingt années suivantes, plusieurs cas humains d'infection par le RVFV chez des personnels de laboratoire ont été décrits. En 1935, le virus a été isolé avec certitude à partir du tractus respiratoire d'un technicien de laboratoire souffrant d'un pseudo syndrome grippal et ayant travaillé dans une pièce après qu'elle eut servi à l'étude du RVFV [25]. L'année précédente, Schwentker avait rapporté le décès d'un pathologiste qui travaillait sur le virus,

mais la mort était survenue plusieurs semaines après la phase aiguë de la maladie et le virus n'avait pu être isolé sur souris [89].

Evolution fatale 100%	Evolution fatale 50%	Syndrome sévère	Symptômes légers	Virémie	Espèces insensibles
Agneau	Mouton	Homme	Artiodactyles sauvages	Singes africains	Cheval ?
Chevreau	Veau	Singes asiatiques et américains		Lapin	Cobaye
Souris	rat (selon espèces)	Bœuf		Porc	Mangouste
Campagnol		Buffle domestique		Chien	Hérisson
Hamster		Chameau		Chat	Oiseaux
		Ecureuil gris			Tortue
		Chiot			Grenouille
		Chaton			

Tableau I. Réceptivité de diverses espèces animales au *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* (d'après Préhaud 1997).

En 1951 pendant une épizootie en Afrique du Sud, pour la première fois, le virus a été isolé du sang de 5 personnes ayant assisté à l'autopsie d'un animal malade. Cela a entraîné la mise en œuvre d'une enquête séro-épidémiologique rétrospective qui a révélé la présence d'anticorps chez de nombreux habitants des zones touchées par l'épizootie. Par extrapolation, le nombre de cas humains a alors été estimé à 20000. On a également observé les premières complications cliniques, oculaires et neurologiques [44].

En 1975, les premiers décès consécutifs à une infection naturelle ont été observés en Afrique du Sud, où 4 patients ont succombé à une encéphalite associée à une fièvre hémorragique aiguë au cours de la plus importante épidémie endurée par le pays [95, 103].

Ensuite, les épidémies se sont succédées, illustrant bien le caractère émergent de l'infection, lié à l'extension du virus à de plus en plus de zones géographiques [73,107].

La première épidémie humaine réellement définie a touché l'Égypte en 1977. Elle semble avoir éclaté durant l'été, dans le delta du Nil, mais n'a d'abord impliqué que peu de personnes et est restée inaperçue jusqu'en octobre, date à laquelle de nombreux décès avec ictère et manifestations hémorragiques ont attiré l'attention des autorités et permis l'isolement rapide du virus. Parallèlement, une épizootie très importante s'est déroulée chez les animaux domestiques. Les effets conjoints de l'utilisation d'insecticides et de la baisse des températures ont entraîné un affaiblissement de l'épidémie au mois de décembre. Rétrospectivement, on évalue le nombre de cas à plus de 20000 (la fourchette des estimations varie de 20000 à 100000) avec 600 morts, soit un taux de mortalité chez l'homme beaucoup plus élevé que ceux décrits alors. A l'époque, les médecins ayant traité les patients se sont demandés si, outre les facteurs viraux (souche très virulente), cette mortalité importante n'était pas liée au fait que l'Égypte soit une zone d'hyper-endémie pour la schistosomiase, qui provoque une atteinte hépatique chronique. Une surinfection virale normalement bénigne mais survenant sur un terrain hépatique déjà lésé pourrait peut-être se traduire par une atteinte hépatique aiguë avec manifestations hémorragiques secondaires mortelles. Cela permettrait d'expliquer le fait qu'aucun cas mortel de fièvre de la Vallée du Rift aiguë n'ait été rapporté avant l'épidémie de 1975 en Afrique du Sud [44].

L'Égypte a de nouveau été touchée par une épidémie en 1993. Au mois de juillet de cette année, les autorités sanitaires ont noté une augmentation du nombre de consultations pour des problèmes oculaires. Du 2 au 25 juillet, 41 cas de baisse de l'acuité visuelle précédée d'un épisode fébrile ont été recensés, les premiers ayant apparus à la fin du mois de mai. Les examens cliniques ont montré des lésions rétiniennes caractéristiques du RVFV et une recherche du virus a été entreprise. Comme les patients ont été présentés trop tard, le virus n'a

pu être isolé de cas humains, mais la plupart présentaient des anticorps caractéristiques d'une infection récente. Des tissus abortifs obtenus à partir d'une vache et d'un bœuf ont permis l'isolement du virus sur souriceaux, mais tous les moustiques testés à l'époque se sont révélés non infectés [6, 116, 117].

En 1979, le virus avait été isolé à Madagascar, à partir de pools de moustiques et les souches isolées étaient proches des souches fortement virulentes d'Égypte [13]. En 1990, un premier épisode épidémique a été soupçonné sur des avortements plus nombreux et sur la détection d'anticorps chez l'animal et chez l'homme, en particulier des IgM qui disparaissent probablement en moins de trois mois après infection, sans que le virus ne puisse être isolé chez l'animal ou chez l'homme [58]. L'année suivante, au mois de février, l'augmentation des avortements dans des fermes d'élevage a de nouveau été signalée, mais dans une région différente. Cette fois-ci, le diagnostic de fièvre de la Vallée du Rift a été rapidement établi par isolement du virus à partir d'un fœtus animal avorté. Le virus n'a pas été isolé dans d'autres échantillons [59].

Au mois de décembre 1997, après des inondations dues à de fortes pluies, le ministère kenyan de la santé a été prévenu de plus de 400 décès inexplicables dans le nord-est du pays [118]. Cette épidémie de RVFV s'est ensuite étendue à la Somalie et à la Tanzanie. Le nombre d'infections humaines pourrait alors avoir atteint 89000, ce qui en ferait l'épidémie la plus importante en Afrique de l'Est depuis la découverte du virus. Les études phylogénétiques ont permis de rattacher les souches isolées à celle impliquées dans les autres épidémies d'Afrique de l'Est et de Madagascar en 1991 [80].

En Afrique de l'Ouest, bien qu'il ait été montré une circulation du virus depuis 1974, date à laquelle il a été isolé au Sénégal à partir de moustiques *Aedes (Aedimorphus) dalzieli*, le seul épisode épidémique connu est celui de 1987, en Mauritanie. L'épidémie a débuté en octobre 1987 à Rosso, au bord du fleuve qui sépare la Mauritanie du Sénégal. Les premiers

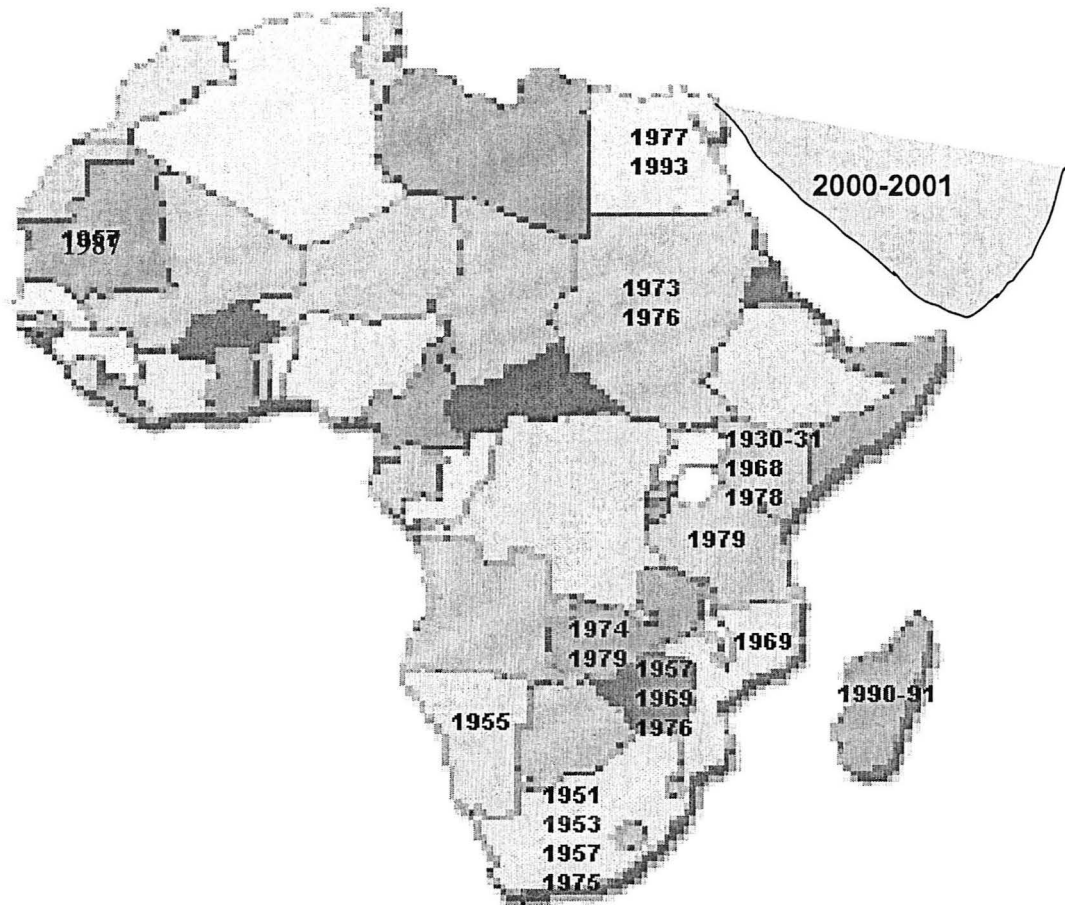


cas ont été identifiés dans un hôpital tenu par des médecins militaires français qui ont d'abord pensé à la fièvre jaune. A l'arrivée de la saison sèche, en 1988, l'épidémie a pris fin progressivement après avoir causé au moins 1500 cas dont 200 morts. Cependant, seuls quelques cas sporadiques ont été détectés au Sénégal [18, 71].

En septembre 2000, la fièvre de la Vallée du Rift a été signalée pour la première fois en dehors de l'Afrique et des cas ont été confirmés en Arabie Saoudite et au Yémen. Au début du mois de novembre 2000, 516 cas avaient été recensés, dont 87 décès (17%). Là encore, la prolifération de deux espèces de moustiques, *Culex triaeniorrhynchus* et *Aedes caspius* consécutive à l'irrigation massive de plaines agricoles, semble expliquer l'émergence de l'infection. Cette épidémie pose le problème de l'extension du virus et de sa capacité à s'établir quasiment n'importe où dans le monde à partir du moment où un vecteur est disponible et qu'il existe un réservoir animal potentiel [5, 119, 120]. La carte n°1 résume les localisations des différentes épidémies de fièvre de la Vallée du Rift ainsi que les dates.

A côté des épidémies brutales, il existe également une circulation silencieuse du virus, aussi bien chez l'animal que chez l'homme. C'est par exemple ce qui a été montré au Nigéria où une étude sur des prélèvements réalisés entre 1985 et 1989 a mis en évidence la circulation du virus chez l'homme et la faune domestique avec des taux d'infection plus importants à la saison humide [66, 67].

Un travail similaire mené en Zambie et utilisant des vaches sentinelles, a montré l'existence d'épisodes épizootiques entre 1974 et 1978 avec plus de 80% d'animaux sentinelles positifs. Une horde sentinelle exposée entre 1982 et 1986 a montré que chaque année des infections à RVFV avaient lieu. En 1985-1986, plus de 20% des animaux ont montré une séroconversion et ce fait a été associé avec des changements dans la végétation [17].



Carte n°1. Dates et lieux des épidémies et épizooties provoquées par le *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*.

2. Cycle viral. Facteurs d'émergence

2.1. Cycle viral

Le cycle naturel du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* implique plusieurs espèces : des vecteurs (insectes) qui transmettent le virus à de nombreux hôtes par piqûre, mais qui ne sont pas affectés par l'infection ; des hôtes vertébrés, qui sont soit des animaux sauvages, soit du bétail, soit des animaux domestiques. Ils sont plus ou moins affectés par l'infection et ont un rôle d'amplification puisqu'ils peuvent à leur tour infecter d'autres moustiques qui se nourrissent de leur sang ou d'autres animaux, par aérosolisation à partir des tissus de fœtus avortés ou d'animaux abattus. L'homme se contamine généralement accidentellement à partir des fluides d'animaux infectés, plus rarement après piqûre par un insecte. En fait, plusieurs cycles viraux sont à distinguer, qui n'impliquent pas forcément les mêmes acteurs. Il existe tout d'abord un cycle endémique naturel qui permet le maintien du virus dans l'environnement. Pour cela, la transmission transovarienne reste actuellement la meilleure explication. En effet, le virus a été isolé à partir de moustiques *Aedes* mâles et femelles provenant de larves et de pupes collectées sur le terrain et élevées en laboratoire [46]. Le virus se maintiendrait dans des œufs en dormance qui peuvent survivre plusieurs années enfouis dans le sol et n'éclorent qu'après une période de pluie intense. Après éclosion des œufs et développement des larves, les moustiques porteurs contaminent différents vertébrés et en particulier les animaux d'élevage : c'est le cycle enzootique. Cependant, l'étude des infections naturelles ou expérimentales a aussi montré que le virus infectait un très large éventail d'animaux, chez lesquels les manifestations cliniques varient énormément (tableau I). Cela suggère l'existence d'un réservoir sauvage qui participerait au maintien du virus entre les épidémies. Ainsi, les rongeurs, particulièrement les muridés, ont été désignés comme hôtes

potentiels et régulièrement des études séro-épidémiologiques sont réalisées dans des populations de vertébrés, révélant de nouvelles espèces réceptives [75].

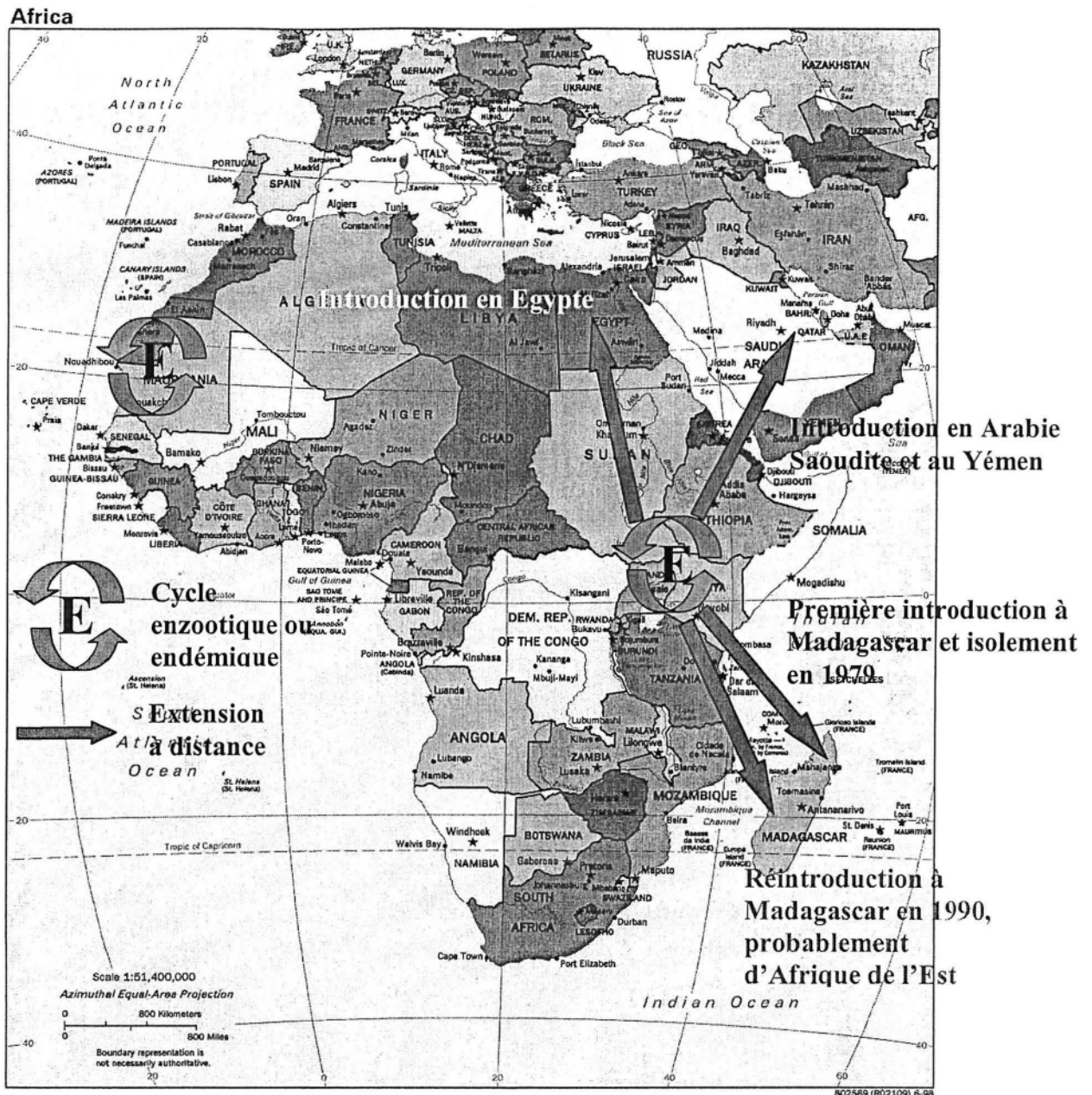
En partant du cycle enzootique, l'amplification qui provoque l'épizootie se fait lors d'une augmentation très importante de la population de moustiques. Expérimentalement, il a été montré que le RVFV pouvait aussi infecter une mouche des sables, *Phlebotomus duboscqi*, soit après inoculation intra-thoracique soit après un repas sanguin sur un hamster. Une fois infectées, les mouches ont pu transmettre le virus à l'animal [98]. Cependant, contrairement aux moustiques, les larves sont restées résistantes à l'infection et le virus n'a jamais été isolé sur le terrain à partir de mouches des sables au cours d'études qui ont permis l'isolement d'autres arbovirus [23]. Dans l'épisode épidémique qui accompagne généralement l'épizootie, la transmission secondaire à l'homme résulte majoritairement d'aérosolisation à partir de fluides d'animaux infectés et non pas de piqûres [103]. Cette contamination peut aussi se faire par ingestion de lait cru. Ainsi, comme pour d'autres arboviroses, la contamination humaine représente probablement une transmission accidentelle par rapport un cycle classique vecteur-hôte naturel [73]. Contrairement à d'autres virus comme Ebola ou Marbourg, il, n'a jamais été signalé de contamination secondaire, bien qu'une équipe ait rapporté la détection du virus à partir de sécrétions nasopharyngées, ce qui implique l'existence d'un mode possible de dissémination virale par gouttelettes aéroportées [1].

2.2. Facteurs d'émergence et d'extension

La carte n°2 montre les deux régions d'émergence du virus et l'extension de l'infection. On voit bien qu'il y a deux situations différentes : d'un côté l'Afrique de l'Est et l'Afrique Centrale. Là, le virus a d'abord été décrit au Kenya puis s'est étendu progressivement vers le sud (Madagascar) et vers le nord (Egypte puis Péninsule Arabique).

La progression du virus crée de plus en plus de zones d'endémie où éclatent des épidémies dès que les conditions climatiques et écologiques sont réunies. De l'autre côté, à l'ouest, le virus circule de manière endémique en Mauritanie, au Sénégal, en Guinée, au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire, au Bénin et au Togo, au Niger et au Mali. Cependant, une seule épidémie humaine a été recensée et le virus semble se limiter à une zone de transmission active et de multiplication.

Si on s'attache à comparer plus précisément les modes de circulation du virus dans les différentes zones où il a été mis en évidence (soit isolé soit par détection d'anticorps montrant sa circulation), on voit que la situation n'est pas identique partout. Les vecteurs ne sont pas exactement les mêmes et les facteurs qui déclenchent ou favorisent les épizooties et les épidémies semblent différer aussi. En Afrique de l'Est et en Afrique du Sud, le virus est transmis aux vertébrés par les moustiques du genre *Aedes* (sous genre *Aedimorphus* et *Neomelanicion*), qui assurent également la conservation par transmission transovarienne [24]. La prolifération des moustiques à la suite de l'inondation des zones de ponte, entraîne la contamination du bétail et de l'homme. Pendant l'épidémie, d'autres espèces de moustiques peuvent aussi servir de vecteurs. Sur ce point, Linthicum a comparé les épidémies ayant eu lieu en Afrique de l'Est entre 1950 et 1998 avec des données climatiques obtenues par satellite (température des océans Pacifique et Indien, hauteur des précipitations et indices de variation de la végétation). Il a suggéré qu'il pourrait être possible, via la surveillance par satellite, d'anticiper les épidémies ou épizooties en Afrique de l'Est 2 à 5 mois à l'avance.



Carte n°2. Modèle d'émergence et de circulation possibles du virus de la fièvre de la Vallée du Rift avec d'un côté l'extension des épidémies à partir du foyer original du Kenya et de l'autre côté la circulation à bas bruit du virus à l'ouest du continent (d'après Sall 98).

Cela permettrait de vacciner les animaux domestiques et de traiter préventivement les futurs zones inondées pour éviter la recrudescence de moustiques [45].

En Afrique de l'Ouest, la situation n'est pas exactement la même. Le virus a été isolé pour la première fois en 1974 chez des moustiques *Aedes (Aedimorphus) dalzieli*, lorsqu'un virus, Zinga, considéré jusque là comme un arbovirus non groupé, a été identifié comme étant une souche de RVFV proche des souches Entebbe et ZH501. [51], puis chez d'autres moustiques *Aedes* et *Mansonia* et même chez des chauves souris en Guinée [9]. Une circulation active du virus a même été enregistrée pendant une période de sécheresse dans le sud de la Mauritanie et au Mali entre 1982 et 1985 [84]. Cependant, la seule épidémie connue est celle de Mauritanie, où le virus existait à l'état endémique dans la savane semi-humide et avait déjà pénétré sous forme d'épizootie au sud du pays [18]. La construction d'un barrage sur le fleuve Sénégal a ensuite créé les conditions de l'émergence d'une épidémie humaine, sans que toutefois elle ne s'étende au Sénégal [107]. Depuis, des enquêtes séro-épidémiologiques successives ont été conduites dans la région sur des ongulés domestiques pour détecter la transmission virale. Ces études ont montré une décroissance de la prévalence des anticorps après l'épidémie, avec un cycle enzootique de maintien du virus apparemment confiné aux zones de climats guinéen [113]. Cependant, la détection d'IgG et d'IgM chez quelques moutons et chèvres a indiqué l'existence d'une transmission du virus au Nord du Sénégal, sans que le virus soit isolé chez des moustiques capturés dans la région de Rosso après l'épidémie de 1987. Des travaux conduits ensuite ont permis d'identifier les vecteurs impliqués dans la transmission inter épizootique du virus dans la région. Il a été isolé en particulier d'*Aedes vexans*, *Aedes ochraceus* et *Aedes dalzieli*. Ces trois espèces diffèrent de celles impliquées en Afrique de l'Est, qui circulent aussi en Afrique de l'Ouest sans que leur rôle dans la transmission n'ait été démontré [24]. La situation qui prévaut pourrait être celle de l'existence de plusieurs foyers endémiques situés dans des zones bio-climatiques

différentes, où le virus se maintiendrait grâce aux moustiques et peut-être aussi grâce aux rongeurs. En effet, des anticorps ont été détectés chez quelques animaux capturés, sans pour autant que le virus soit isolé.

A partir de ces foyers, le virus pourrait se propager et provoquer une épizootie et éventuellement une épidémie, par exemple par l'intermédiaire d'animaux migrants infectés. L'introduction et la propagation du virus dans une aire où le bétail est non-immun génère alors un réservoir animal fortement virémique qui là aussi peut servir de source d'infection, même si les moustiques vecteurs sont peu efficaces mais nombreux. C'est par exemple ce qui s'est passé à l'est, à Madagascar, où l'épisode épidémique de 1991 est survenu pendant une saison plus sèche que les années précédentes et la population de moustiques n'était pas plus abondante que d'habitude. Par contre les routes suivies par le bétail pour gagner les régions d'abattage provoque le déplacement des bêtes d'une zone où le virus circule, donc virémiques, vers une zone où les animaux sont non-immuns et où un vecteur (*Culex*) prolifère [59]. Les facteurs climatiques jouent aussi sûrement un rôle dans le déclenchement des épizooties et la propagation du virus, mais il n'a pas été possible d'établir une relation comme ça a été le cas en Afrique de l'Est [112].

La compréhension de l'épidémiologie et de la circulation est importante pour les stratégies de prévention : dans le cas d'une activité virale cyclique (comme en Afrique de l'Est), les relevés pluviométriques sont utilisés et des campagnes de vaccination des animaux sont entreprises dès que les pluies sont plus importantes que la normale ; si la situation épidémiologique est similaire à celle d'Afrique de l'Ouest avec d'importantes migrations de troupeaux, les enquêtes épidémiologiques et sérologiques des hommes et des animaux d'élevage sont associées à la vaccination du bétail migrant [58]. La figure n°1 résume les différents cycles que nous venons de décrire ainsi que les facteurs pouvant jouer un rôle dans le maintien du virus dans la nature et le déclenchement des épidémies.

A côté de ça, Il existe d'autres facteurs d'émergence et d'extension des foyers infectieux, plus généraux, liés à la nature des vecteurs, des hôtes et des zones concernées (facteurs économiques, démographiques). Le tableau II résume ces facteurs d'émergence dans le cas du RVFV, décrits et analysés par Wilson [109]. On peut prendre comme exemple les travaux menés sur la capacité de transmission du virus par les moustiques. On sait que certaines espèces sont sensibles à certaines infections virales mais ne peuvent pas transmettre le virus à cause de la nature de la barrière des glandes salivaires. La question s'est donc posée de savoir si une altération biologique de cette barrière, par exemple par un parasite pouvait rendre la transmission possible. Pour cela, des moustiques (*Anopheles stephensi*) ont été artificiellement infectés par le RVFV et nourris soit avec du sang normal soit avec du sang contenant des gamétocytes de *Plasmodium berghei*, un agent responsable du paludisme. Tous les moustiques nourris sur le sang normal se sont montrés incapables de transmettre le virus à des rongeurs, alors que le taux de transmission pour ceux nourris avec un sang contenant des gamétocytes est passé à 32% [104]. Ces résultats vont dans le même sens que ceux conduits en 1984 avec les microfilaries. En travaillant sur *Aedes taeniorhynchus*, les chercheurs avaient montré que la co-ingestion d'une quantité donnée de virus associé à des microfilaries (*Brugia malayi*), provoquait l'infection de 88% des moustiques, avec un taux de transmission de 31% après piqûre d'un hôte contre respectivement 64% d'infection et 5% de transmission [100]. Ceci illustre bien le fait qu'une endémie parasitaire, dont la persistance est souvent liée à des facteurs autant économiques (manque de fonds pour acheter les traitements) que biologiques, peut favoriser l'émergence dans la même zone géographique d'une infection virale qui viendra aggraver l'état sanitaire de la population. De la même façon, le développement exponentiel du commerce d'animaux d'élevage (ovins et bovins) d'un pays et d'un continent à l'autre a permis l'extension du virus hors d'Afrique.

Finally, it must also be added that the zones affected by the epidemics of RVFV show clearly that the virus was first isolated in East Africa (in Kenya), then spread to almost the entire continent and finally to the Arabian Peninsula. The phylogenetic studies described further, have allowed each epidemic to be associated with specific viral strains, grouped into three « clusters » different. Thus, while the « cluster » West Africa corresponding to strains from Senegal, Mauritania, Guinea and Burkina Faso has proved relatively homogeneous, it is not the same for the other two (Egypt and Central Africa and East Africa). For example, the group East Africa and Central Africa also includes strains isolated in Uganda, in Central Africa, in Mauritania, in Senegal and in Madagascar [83].

This heterogeneity indicates a circulation of the virus from one zone to another and may explain in part the regular emergence in new countries.

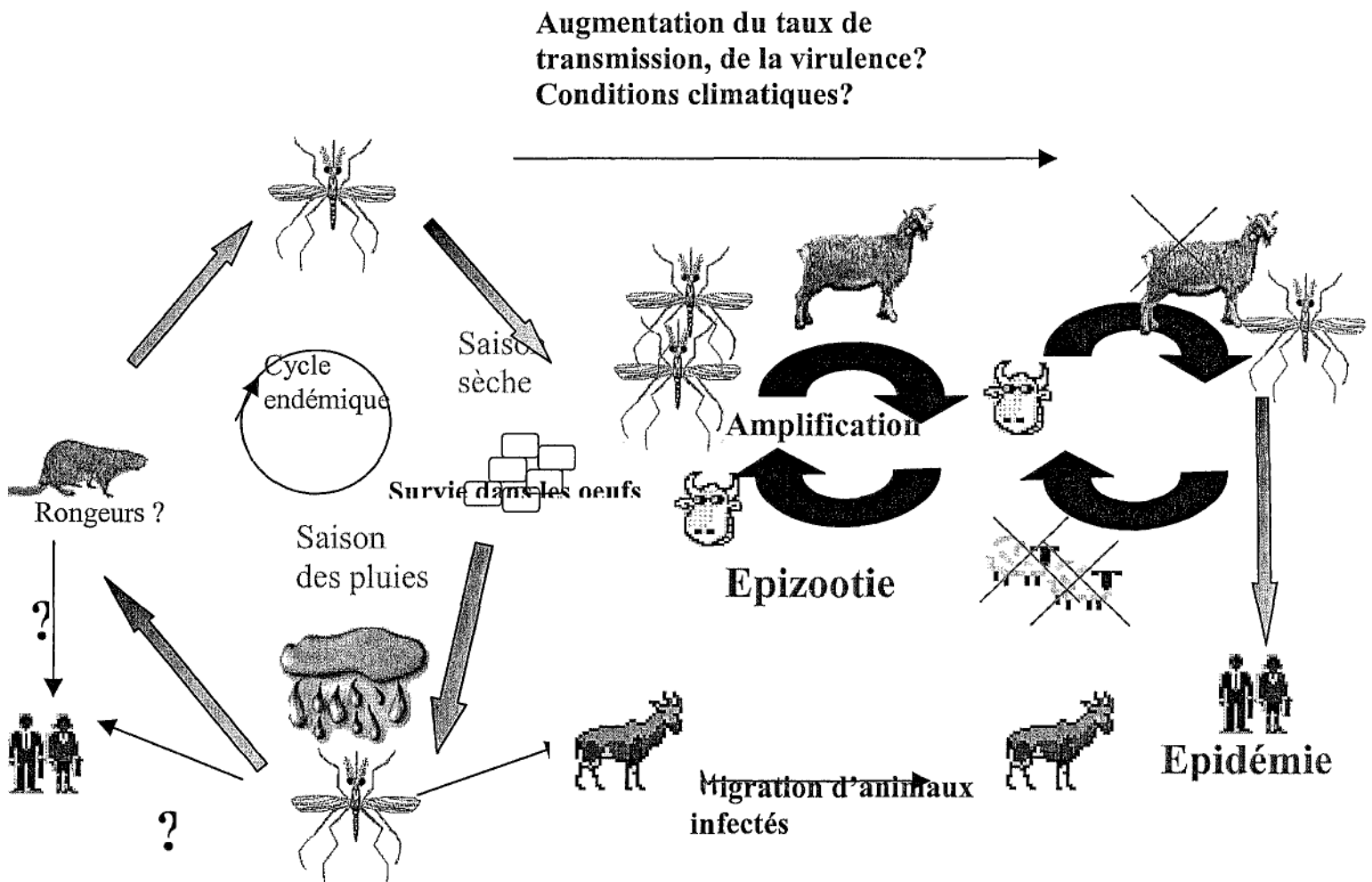


Figure n°1. Cycles possibles du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*. Le maintien enzootique se fait dans les œufs enterrés dans les marigots et peut-être aussi chez des rongeurs. A partir de ce cycle, l'augmentation brutale de la transmission par les moustiques causée par différents facteurs (pluies, virulence) entraîne la contamination des animaux d'élevage. C'est l'épizootie. Il peut aussi y avoir contamination du bétail migrant qui déplace l'infection vers une zone non-immune. Si l'épizootie est très importante, l'homme est touché à son tour et c'est l'épidémie (d'après Zeller 1997).

Facteurs d'émergence	Exemples relatifs à RVFV
Développement économique et utilisation des terres	Barrages et irrigation, amélioration des pâturages
Démographie et modes de vie	Cohabitations avec les animaux domestiques hôtes, abattage d'animaux malades, vaccination d'animaux sains (souches vivantes)
Voyages internationaux et commerce	Exportation d'ovins et de bovins, déplacement des populations (migrations, voyages)
Changements et adaptation biologique	Augmentation de la virulence virale, amélioration de la compétence des vecteurs, plus grande sensibilité des animaux hôtes
Evènements climatiques	

Tableau II. Résumé des facteurs d'émergence du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* décrits en analysés par Wilson (d'après Sall 1998).

3. Clinique

3.1. Définition clinique de la maladie

Le Center for Disease Control and prevention (CDC), organisme américain de surveillance épidémiologique, donne une définition des critères cliniques et biologiques pronostics d'une infection par RVFV. Il s'agit d'une maladie inexpliquée depuis plus de 48 h associée à une élévation des transaminases d'au moins trois fois la valeur de référence (aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase et gamma glutamyl transpeptidase) ou à un ictère ; ou associée à un avortement ou à des manifestations hémorragiques (ecchymoses, pétéchies, purpura, épistaxis, saignements gastro-intestinaux ou ménorragies) ; ou associée à des manifestations neurologiques (vertiges, confusion, désorientation, amnésie, léthargie, hallucinations, meningismus, ataxie, douleurs, convulsion, hémiparesthésie ou coma) ; ou associée à de la fièvre, diarrhée, nausée, vomissements ou douleurs abdominales et un des critères biologiques suivants : 1) hémoglobine $< 8\text{g/dL}$; 2) plaquettes $< 10.10^{10}/\text{L}$; 3) LDH $> 2n$; 4) créatinine $> 150\text{mol/L}$; 5) CPK $> 2n$; ou décès inexpliqué avec un historique de fièvre, léthargie, diarrhée, douleur abdominale, nausée, vomissements ou maux de tête au cours des deux semaines précédentes.

Cette définition très large, résulte en fait des observations réalisées chez l'homme au cours des différentes épidémies et reprend globalement la grille pronostique proposée après l'épidémie de 1987 par Adam et Jouan. Il donne un exemple de la répartition des patients en fonction des différentes pathologies [1, 4, 103].

Le tableau III présente une partie des résultats de l'enquête épidémiologique réalisée au cours de cette épidémie qui a éclaté en octobre 1987 en Mauritanie, dans la région de Rosso et a été identifiée par des médecins militaires [19, 34, 71].

Aux manifestations cliniques décrites ci-dessus, il convient d'ajouter les complications possibles qui peuvent apparaître jusqu'à 20 jours après les premiers signes cliniques. Plusieurs articles publiés après les épidémies de 1977 en Afrique du Sud et en Egypte décrivent précisément les conséquences anatomo-pathologiques chez l'homme. Ces complications apparaissent en général sous la forme d'un ou plusieurs syndromes reconnaissables : pathologie oculaire, méningo-encéphalite ou fièvre hémorragique. La proportion des patients qui développent ces trois types de complications se situe entre 0,5 et 2%, pour la pathologie oculaire et moins de 1% pour la méningo-encéphalite ou le syndrome hémorragique [44].

La fièvre et les autres symptômes décrits ci-dessus et dans le tableau suivant peuvent se manifester en association avec une pathologie oculaire prenant la forme caractéristique de lésions rétiniennes. Celle-ci apparaît généralement entre une et trois semaines après les premiers symptômes. Lorsque les lésions touchent la tache jaune, il arrive qu'une baisse permanente de l'acuité visuelle s'ensuive. Les décès sont rares chez les patients atteints seulement de la pathologie oculaire.

Un autre syndrome se manifeste par une pathologie neurologique aiguë, sous forme de méningo-encéphalite. L'apparition de ce syndrome a lieu également en général entre une et trois semaine après les premiers symptômes et là aussi, les décès sont rares.

L'infection par le RVFV peut également prendre l'apparence d'une fièvre hémorragique. Deux à quatre jours après le début de la maladie, le patient présente les signes d'une atteinte hépatite grave avec un ictère et des phénomènes hémorragiques : vomissements de sang, hématomèses, purpura ou gengivorragies. Les malades atteints du syndrome hémorragique peuvent rester virémiques jusqu'à dix jours après infection. Le taux de mortalité est élevé.

Formes cliniques	nb de cas	%	nb de décès	%
Forme commune	110	39	1	<1
Forme ictérique	88	31	6	7
Forme hémorragique	17	5,7	2	11,5
Forme ictéro-hémorragique	47	16,6	18	36
Forme neurologique	17	5,7	2	11,5
Forme oculaire d'apparition tardive	5	2		
Total	284		29	10,2%

Tableau III. Formes cliniques observées lors de l'épidémie de fièvre de la Vallée du Rift en 1987 chez les patients hospitalisés à l'hôpital de Rosso (Mauritanie). Taux de mortalité pour chacune de ses formes (d'après Digoutte 1999).

3.2. Prophylaxie et traitement

3.2.1. Prophylaxie

Deux approches différentes ont été utilisées pour la mise au point d'une prophylaxie contre le RVFV. Il y a d'abord l'immunisation dite active qui consiste à vacciner un individu pour sensibiliser son système immunitaire qui induira ensuite une protection immunitaire humorale et/ou cellulaire lors d'un contact ultérieur avec l'agent pathogène. Le vecteur vaccinal peut être soit le virus entier, vivant atténué ou inactivé, soit une fraction du virus, qui est suffisamment immunogène pour induire une réponse protectrice durable. L'autre méthode, l'immunisation passive, consiste en un simple transfert d'anticorps spécifiques de l'agent pathogène, soit purifiés, soit avec le sérum. Cela nécessite notamment la connaissance des propriétés immunogènes des différents composants viraux (glycoprotéines d'enveloppe par exemple) afin de connaître la nature des anticorps produits et de leurs épitopes de liaison.

Au niveau vaccinal, les premières techniques ont consisté à utiliser des souches virales vivantes atténuées soit naturellement soit par passages successifs sur culture de cellules. La première souche décrite est la souche neurotrope Smithburn qui a été obtenue par atténuation de la souche virulente Entebbe par passages intracérébraux successifs sur souris [91]. Elle a été ensuite largement employée comme souche vaccinale, mais a toujours posé des problèmes quant à l'existence de risques de tératogénicité et d'abortogénicité, alors même que les animaux à risque sont justement les femelles en gestation et les jeunes animaux.

Une autre méthode d'atténuation plus récente consiste à cultiver un virus pathogène en présence d'un agent mutagène et à évaluer en parallèle l'évolution de sa capacité répliquative et de sa pathogénicité *in vitro* et *in vivo* jusqu'à obtenir une souche qui se multiplie et soit immunogène, tout en étant suffisamment atténuée pour que son administration ne soit pas dangereuse pour l'hôte. En 1985, une équipe a ainsi décrit la mise au point d'un vaccin vivant atténué par mutagenèse dirigée. Pour cela, la souche virulente ZH548 (isolée en Egypte) a été cultivée en présence d'un agent intercalant, le 5-fluorouracil. En parallèle, chaque passage a été étudié sur des critères de titre infectieux en culture de cellules et de la survie de souris vaccinées puis infectées avec une autre souche virulente, la souche ZH501. Le virus obtenu au passage n°12 qui a été retenu, se multipliait en culture de cellules mais était avirulent pour l'animal et offrait une protection efficace contre la souche ZH501, à condition que les animaux aient reçu une dose supérieure à 10^2 PFU [12]. Depuis, l'utilisation a été validée chez l'homme et chez l'animal. Par rapport à la souche Smithburn, la souche MP12 présente l'avantage d'être sûre, immunogène et d'offrir une protection chez le jeune veau ou jeune agneau, avec toutefois une certaine réserve, la vaccination de brebis en gestation ayant montré que le virus était tératogène pendant le premier trimestre [52-54]. Actuellement, l'usage en reste réservé aux personnels exposés et le vaccin n'a pas d'AMM en France.

Plusieurs travaux ont permis de caractériser la nature des mutations de MP12 et de leur rôle dans l'atténuation. En effet, la nature tri segmentée du génome de RVFV implique la possibilité de l'existence de virus recombinants associant des brins d'ARN de souches différentes ayant infectées un même individu. Ainsi, si la ou les mutations conférant le caractère atténué d'une souche ne sont contenues que sur un seul brin, il est possible que cette souche redevienne virulente en échangeant ce brin contre un provenant d'une souche virulente. Le même problème se pose avec les souches vaccinales vétérinaires, où les animaux vaccinés peuvent devenir des réservoirs d'une nouvelle souche recombinante et provoquer une épidémie. Sur la souche MP12, un total de neuf, douze et quatre nucléotides sont mutés respectivement sur les brins L, M, et S par rapport à la souche initiale ZH548. Trois mutations ont induit des changements de la séquence d'acides aminés de la protéine L, mais aucun n'est localisé dans les motifs reconnus, conservés au sein des polymérases ARN dépendantes. Dans le brin M, sept des mutations ont entraîné la modification d'acides aminés dans chacune des quatre protéines G1, G2, 14 kDa et 78 kDa et dans le segment S, une seule mutation s'est traduite par un changement d'acide aminé dans la protéine NSs [96, 106].

Actuellement, une autre souche, naturellement atténuée cette fois ci, est en cours d'étude comme candidat vaccinal potentiel. Il s'agit du clone 13 qui a été isolé à partir d'un individu infecté par une souche (la souche 74HB59), composée d'une population hétérogène de virus. Ce clone, isolé sur plaque, s'est révélé avirulent chez la souris et le hamster et cependant hautement immunogène [61]. Là aussi, l'origine de l'atténuation a été identifiée, mais nous y reviendrons dans le chapitre consacré à l'organisation génomique.

Plusieurs autres vaccins candidats ont été produits par inactivation chimique, souvent par des produits dérivés du formol. Un a été produit en Afrique du Sud mais nécessitait de nombreuses vaccinations pour assurer une protection durable. Il est resté limité à un usage vétérinaire [7,8]. Un autre (NDBR-103), à usage humain, avait été développé avant sur des

cellules de reins de singe [76]. Ce vaccin avait été évalué chez la souris et le hamster. En 1984, l'équipe de Niklasson a produit une souche inactivée, toujours par le formol. Chez le hamster, la vaccination a été comparée à une immunisation passive avec des sérums immuns suivie d'une infection. Dans un deuxième temps, ce vaccin a été administré à des volontaires (des soldats suédois des Nations Unies stationnés dans la Péninsule du Sinaï) afin de déterminer les titres en anticorps. Un groupe a pu être vacciné trois fois (J_0 , J_{7-10} et J_{28-30}) et suivi pendant deux ans. Six mois après la vaccination, 88% avaient des anticorps détectables, et un et deux ans après vaccination, les taux de séropositivité étaient respectivement de 91% et 74%. Les résultats ont aussi montré que la réponse anticorps était diminuée avec l'augmentation de l'âge des volontaires. Seuls quelques effets indésirables locaux ou généraux ont été rapportés et ces réactions se sont produites chez les individus présentant une réponse anticorps relativement forte [63, 65]. Auparavant, la même équipe avait détecté des anticorps anti-RVFFV chez quelques soldats ayant servi en Egypte et dans le Sinaï, montrant ainsi qu'ils avaient été exposés au virus [64].

Une autre souche vaccinale pour l'homme a été développée par l'armée américaine. Pour cela, une souche a été inactivée avec le même principe que celui utilisé par Randall, mais amélioré et après expériences pré-cliniques, elle a été testée chez l'homme. Ce vaccin, TSI-GSD-200, a été administré entre 1986 et 1997 à 598 volontaires incluant tous les biologistes, mécaniciens et électriciens amenés à entrer dans les zones où le RVFFV était étudié. Ils ont reçu trois primo injections à J_0 , J_7 et J_{28} puis un ou plusieurs rappels jusqu'à preuve de leur séroconversion. Les résultats ont montré un taux de 90,3% de réponse dès les primo injections. Après les premières séries et les rappels éventuels, les analyses statistiques ont montré que les personnes ayant répondu dès le début et après rappel, avaient 50% de chance de maintenir un titre en anticorps protecteurs suffisant pendant au moins huit ans. Le recul a permis de vérifier l'innocuité du vaccin [72].

En 1992, l'équipe de London a décrit une méthode originale pour l'expression d'antigènes viraux chez la souris, éventuellement dans un but vaccinal. En effet, un virus chimère a été synthétisé contenant d'une part les séquences codant pour les protéines structurales d'un *Alphavirus*, le virus Sindbis et d'autre part un oligonucléotide codant pour les onze acides aminés d'un épitope de neutralisation dérivé de la glycoprotéine G2 de RVFV. Cet oligonucléotide a été inséré au hasard dans la séquence de Sindbis. Les clones infectieux après insertion ont été sélectionnés sur plaque et les sites d'insertion ont été déterminés pour les virus chimères présentant les mêmes caractéristiques de croissance que le virus initial. Dans ce cas là, l'oligonucléotide s'était inséré dans les zones codant pour la glycoprotéine E2 et la glycoprotéine secrétée E3 de Sindbis. Pour la chimère E2, l'épitope été exprimé à la surface du virion et a stimulé une réponse immunitaire partielle contre une infection à RVFV chez des souris immunisées par deux injections par voie intrapéritonéale, entraînant une survie prolongée et une augmentation du pourcentage de survie, mais sans qu'il y ait des animaux complètement protégés [47]. Ce travail rapporte une voie originale qui pourrait permettre de vacciner des animaux contre le RVFV en les infectant avec un virus chimère exprimant les antigènes d'intérêt.

De manière anecdotique, RVFV a aussi servi à caractériser une immunité antivirale non spécifique, décrite par Zvilich et *al.* Cette équipe a utilisé des fractions de cellules de souches de *Coxiella burnetii* qu'ils ont administré à des souris. La fraction chloroforme-méthanol administrée en une seule dose, 24 h avant le challenge viral a protégé 100% des animaux et entraîné la disparition de 4 à 5 log de particules infectieuses dans le sérum, le foie, la rate et le système nerveux central. Par contre, cet effet protecteur disparaissait si l'administration avait lieu 2 à 3 jours avant le challenge, même si une deuxième ou troisième dose était administrée post-infection. L'encapsulation dans les liposomes de la fraction a étendu l'effet protecteur à quatre jours avant le challenge. La même équipe a ensuite

caractérisé cette protection particulière. Il a été montré que la fraction stimule la production de grandes quantités d'FN α/β et γ et qu'elle était un immunostimulant potentiel qui pouvait moduler les réponses antivirales spécifiques et non spécifiques [114, 115]

En conclusion, il existe plusieurs souches vaccinales, mais soit elles posent un problème de dangerosité potentielle (Smithburn), soit elles restent réservées aux seuls personnels exposés professionnellement ou aux militaires (MP12) et sont inaccessibles pour les populations qui en auraient le plus besoin, par exemple lors de la détection d'une épizootie où il serait nécessaire de vacciner les personnels exposés (abattoirs, laboratoires, fermes d'élevage).

3.2.2. Traitement

Plusieurs équipes ont travaillé à l'étude de l'efficacité de substances antivirales contre le RVFV. En particulier deux substances les plus couramment utilisées *in vitro* ou *in vivo* contre d'autres virus responsables de fièvres hémorragiques ou du même genre ont fait l'objet de très nombreux travaux, il s'agit de la ribavirine et l'interferon (IFN) [15, 90]. Dès 1980, l'activité antivirale de la ribavirine a été décrite [93]. Ensuite, les résultats expérimentaux se sont accumulés, tant en culture de cellules que chez l'animal. Après les travaux de Canonico [11], Kende a utilisé une molécule inductrice de l'IFN, le poly(ICLC). Il a d'abord montré qu'elle protégeait des souris femelles contre une injection normalement mortelle de RVFV et induisait une forte production d'IFN. Ensuite, il a montré que l'administration conjointe de poly(ICLC) et de ribavirine, au plus tard 48h après l'infection des souris, était efficace même quant aux doses retenues, les molécules administrées séparément étaient inefficaces [38]. En parallèle, il a aussi essayé d'améliorer l'index thérapeutique de la ribavirine, qui présente des effets indésirables chez l'homme, en utilisant des liposomes comme transporteurs. Ce système

testé chez la souris, a permis d'obtenir dans le foie, qui est le site primaire de prolifération virale, des concentrations cinq fois plus importantes pour une même posologie de ribavirine libre, ce qui permet d'atteindre l'efficacité recherchée à des doses beaucoup moins toxiques [37]. En 1986, les travaux de Peters et *al*, ont confirmé l'efficacité de la ribavirine et du poly(ICLC), d'une part *in vitro* sur culture de cellules et d'autre part *in vivo* sur différents modèles animaux. Ces deux molécules administrées de manière thérapeutique ont permis une réduction conséquente de la mortalité des animaux (souris et hamster) entre 75% et 100%. De plus, chez le singe, la ribavirine a entraîné une diminution quasi complète de la virémie des animaux traités par rapport aux animaux non traités. Ce même travail a également montré l'efficacité de l'immunisation passive de souris avec des anticorps issus de liquides d'ascite de souris ayant reçu une souche virale inactivée [70].

En 1991, Morrill et Peters ont administré un IFN γ humain recombinant à des singes Rhésus. Cette fois-ci, le protocole employé a été à la fois prophylactique (1 injection 24 h avant l'infection) et thérapeutique (1 injection par jour pendant 5 jours). Les singes ainsi traités ne présentaient pas de signes cliniques, voire même pas de virémie détectable pour certains. Si quelque-uns ont quand même eu une charge virale détectable, les titres infectieux mesurés *in vitro* sont restés largement inférieurs à ceux mesurés à partir des animaux non traités [54]. Ces résultats ont confirmé ceux précédemment obtenus par la même équipe avec l'IFN α sans qu'il soit possible de montrer une synergie entre les deux molécules [56]. En 1996, les travaux publiés par Frese et *al* ont permis d'affiner la connaissance de l'action antivirale de l'IFN. En effet, ils ont montré que l'expression dans des cellules Vero infectées par le RVFV, de la protéine MxA, qui est induite chez l'homme par l'IFN, empêchait l'accumulation de transcrits viraux et des protéines correspondantes et entraînait une réduction de 4 log des titres infectieux en culture de cellules. Ces résultats ont été reproduits sur d'autres *Phlebovirus* (virus La Crosse, virus SFS) et sur le virus Hantaan (*Hantavirus*).

Cela montre que cette protéine exprimée seule possède une forte activité antivirale *in vitro* et ce, dès les premières étapes du cycle viral, peut-être au niveau du complexe ARN polymérase et que MxA est un médiateur intracellulaire des effets antiviraux de l'IFN. Son action précoce expliquerait le fait que l'IFN ait souvent une action thérapeutique limitée dans les fièvres hémorragiques [30]. S'il était administré plus tôt après l'infection, les patients bénéficieraient d'une meilleure efficacité, comme cela a été montré dans les modèles animaux [26].

En parallèle, d'autres molécules ont été testées *in vitro*. Ainsi, les équipes de Wood et de Westover ont rapporté l'activité antivirale de molécules qu'ils avaient synthétisées sur le RVFV en culture de cellules Vero ou sur souris, sans que les résultats soient aussi intéressants que ceux que nous venons de détailler [108, 110]. De même, Gabrielsen et *al* ont décrit l'activité antivirale *in vitro* de 23 alcaloïdes isoquinoléiques extraits ou de synthèse. Plusieurs se sont révélés efficaces contre RVFV et également contre d'autres virus du même genre, les virus Punta Toro (PTV) et Sandfly Fever Sicilian (SFSV). Cependant, La plupart de ces molécules actives ont présenté une faible sélectivité et une cytotoxicité pour les cellules non traitées [27].

Globalement, les résultats les plus intéressants sont ceux qui ont été obtenus avec la ribavirine et l'IFN et qui explique l'essai clinique en double aveugle d'utilisation thérapeutique de la ribavirine mis en œuvre lors de la dernière épidémie en date, en Arabie Saoudite [119]

4. Organisation génomique et réplication. Phylogénie

Comme les autres *Phlebovirus*, le *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* possède un génome constitué de 3 brins d'ARN simple brin de polarité négative. Ces brins sont désignés sous les noms S (brin court), M (brin moyen) et L (brin long). Tous présentent à leur extrémité 5' et 3' des séquences complémentaires qui permettent une circularisation de l'ARN

au sein de la nucléocapside virale (tableau IV). Ils codent pour un ensemble de composants viraux structuraux ou non structuraux et ce avec des stratégies différentes.

Brin d'ARN	Extrémité 3'	Extrémité 5'	N° GenBank
S	3' UGUGUUUCGAGGGAUC	5' ACACAAAGACCCCCT	X53771
M	3'UGUGUUUCUGCCACGU	5' ACACAAAGACCGGUG	M11157
L	3' UGUGUUUCUGGCGGGU	5'ACACAAAGGCGCCCA	X56464

Tableau IV. Séquences terminales consensus des brins d'ARN S, M et L du genre *Phlebovirus* et références GenBank des souches types

4.1. Organisation génomique

4.1.1. Le brin S

Le brin S est composé d'environ 1,7 kpb [29]. Les extrémités 3' et 5' possèdent une séquence complémentaire inverse de 6 à 14 nucléotides qui permettent la circularisation de l'ARN [29]. Au niveau du codage protéique, le brin S utilise une stratégie dite ambisense. En effet, 2 cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés : un dans la moitié 3' de l'ARN viral et un deuxième dans la moitié 5' [29, 86]. Ces deux régions sont séparées par une courte zone intergéniques riche en résidus C [74].

A partir du brin d'ARN viral, il existe deux schémas transcriptionnels et traductionnels. Soit il est directement transcrit en un ARNm qui est ensuite traduit pour donner la protéine de nucléocapside N (ORF1), soit il est d'abord répliqué en un ARN simple brin complémentaire qui est ensuite transcrit et traduit pour donner une protéine non structurale NSs (ORF2) (figure n°2) [29, 86].

Il est à noter que, aussi bien au niveau du brin viral que du brin complémentaire, le signal minimal de transcription est le même et est représenté par les 13 premiers nucléotides de l'extrémité 3' [74].

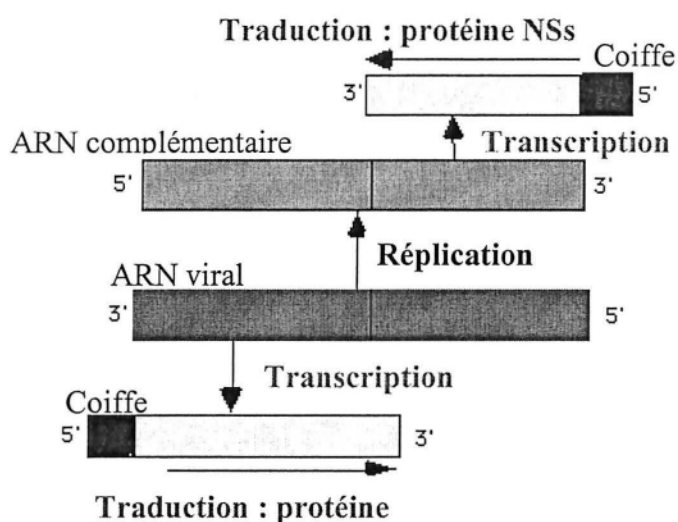


Figure n°2. Stratégie de codage du brin d'ARN S du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*. L'ARN viral porte l'information à la fois pour la protéine N (dans sa moitié 3') et pour la protéine NSs (dans sa moitié 5'). L'ARN complémentaire joue le rôle de matrice pour la synthèse de l'ARN messager de NSs. La coiffe en 5' permet l'initiation des traductions protéiques.

Le rôle de NSs dans la multiplication virale reste encore pour l'instant assez flou. Cependant, Yadani *et al* ont montré qu'elle était présente sous forme phosphorylée dans le noyau des cellules infectées, ce qui est surprenant quand on sait que seul le cytoplasme cellulaire est le lieu de la multiplication virale. De plus, au sein du noyau, les protéines NSs se polymérisent grâce à une dizaine d'acides aminés du domaine C-terminal pour former des structures filamenteuses [111].

Kohl *et al* ont affiné l'étude des mécanismes de phosphorylation de NSs et des enzymes cellulaires impliquées, sans toutefois que se dégage de rôle précis [41]. Plus

récemment, Vialat et *al* ont réussi à associer NSs et la pathogénicité virale à travers l'étude d'un clone viral naturellement atténué, le clone 13. En analysant son brin S, ils ont montré que la délétion de 549 nucléotides, soit 70% de l'ORF2, [61], ne modifiait pas la quantité d'ARNm détectée, mais par contre influait sur la traduction et l'expression protéique. En effet, la protéine NSs du clone 13, qui est délétée de 183 acides aminés, est rapidement dégradée dans le cytoplasme après la traduction. Or, en utilisant des virus recombinants entre une souche virulente (ZH548) et clone 13, la même équipe a constaté que les recombinants possédant le brin S de clone 13 et les brins M et L de ZH 548 étaient complètement atténués *in vivo* (mortalité réduite de 100%) et *in vitro* (pas de plages de lyse sur cellules MRC-5, qui sont des fibroblastes humains). Cela soulève la question de savoir si ce caractère atténué de clone 13 est directement lié à l'importante délétion de NSs. En effet, la protéine N de clone 13 n'est modifiée que sur un acide aminé [105].

Un autre argument en faveur de l'importance de NSs dans la pathogénicité virale résulte du travail de Bouloy et *al* qui ont montré que cette protéine possédait une fonction antagoniste de la production d'IFN α/β chez des souris knock-out pour différents récepteurs aux IFN α , β ou γ et en utilisant des virus recombinants entre clone 13 et la souche virulente ZH548. Ces résultats ont semblé montrer que le RVFV possédait la capacité d'interférer avec la production d'IFN α/β et que cette fonction était corrélée avec la virulence des différentes souches. Un recombinant possédant les brins M et L de ZH548 et le brin S de clone 13 stimulait cette production, alors que la souche sauvage ZH548 n'induisait pas la production de quantités importantes d'IFN. Il semblerait donc que le caractère virulent ou atténué des souches soit pour partie lié à cette capacité à inhiber la production d'IFN par l'hôte lors de la lutte contre l'infection virale [10].

4.1.2. Le brin M

Le brin M est composé d'environ 3,8 kpb. De la même manière que pour S, les séquences situées en 5' et 3' sont complémentaires pour environ 51 résidus et peuvent former une structure secondaire stable.

M contient un seul ORF d'une capacité potentielle de codage de 133 kDa et portant l'information pour les deux glycoprotéines d'enveloppe, G₁ et G₂, et deux autres protéines non structurales de 78 kDa (une forme clivée de G₂) et de 14 kDa [14, 35, 36]. L'ARN viral est transcrit en un seul ARNm à partir duquel la traduction des différentes protéines est initiée grâce à différents codons initiateurs [94]. Les données obtenues *in vitro* semblent indiquer que les processus de biosynthèse mis en œuvre pour les deux glycoprotéines sont distincts l'un de l'autre [94]. De plus, G₁ et G₂ sont efficacement exprimées par un virus de la vaccine recombinant en l'absence des séquences codant pour les protéines non structurales.

Cependant, actuellement, les étapes transcriptionnelles et traductionnelles du brin M restent floues, de même que le rôle exact joué par les protéines non structurales.

4.1.3. Le brin L

Le brin L est long d'environ 6,6 kpb et possède un seul ORF codant pour un polypeptide unique (approximativement 230 kDa) [60, 62]. Par homologie de séquence avec d'autres virus, il en a été déduit que cet ORF codait pour la polymérase virale (L), activité confirmée en utilisant la protéine L exprimée par un virus de la vaccine recombinant pour transcrire des matrices ribonucléocapsidiques [33].

En 1995, Lopez et *al* ont publié un travail où ils ont décrit l'utilisation de la protéine L de RVFV pour transcrire des molécules synthétiques d'ARN. Pour cela, la protéine L a été exprimée dans des cellules grâce à un virus de la vaccine modifié. L'activité transcriptase de L a été évaluée vis à vis de deux matrices : des ribonucléoprotéines naturelles purifiées à

partir de virus et des ARN synthétiques. Les résultats ont montré que les ribonucléoprotéines purifiées ne possédaient plus d'activité polymérase mais que cette activité pouvait être restaurée par co-expression de L. D'autre part, après transfection des ribonucléoprotéines déplétées en transcriptase dans des cellules infectées par le virus de la vaccine recombinant exprimant L, les ARN codant pour les protéines N et NSs et, de manière moins importante, ceux codant pour les glycoprotéines ont été synthétisés, de même que les protéines correspondantes.

Dans un deuxième temps, l'activité transcriptase de la protéine recombinante L a été étudiée en utilisant des matrices synthétiques contenant un gène reporter. Les résultats ont montré que, après transfection des matrices d'ARN, la transcription a eu lieu dans les cellules co-exprimant les protéines L et N, ce qui montre qu'elles sont absolument nécessaires pour reconstituer une activité de transcription [48].

4.2. Les étapes de la réplication

La réplication virales procède d'une série d'étapes communes à tous les membres de la famille de *Bunyaviridae* [86] :

- Attachement à la membrane cellulaire ;
- Entrée et libération de la nucléocapside virale dans le cytoplasme ;
- Transcription primaire par interaction entre composants viraux et cellulaires ;
- Traduction des ARNm primaires L et S par des ribosomes libres et de l'ARNm primaire M par des ribosomes liés à la membrane puis glycosylation des protéines d'enveloppe ;

- Synthèse et encapsidation des ARNc, matrices des ARN viraux génomiques ;
- Réplication génomique ;
- Transcription secondaire, dont la transcription ambisense du brin S ;
- Morphogénèse virale au niveau du Golgi ;
- Fusion des vésicules cytoplasmiques avec la membrane cellulaire et libération de virions matures.

Après fusion entre les virions et la membrane cellulaire et la décapsidation, les ribonucléoprotéines (RNP) sont libérés dans le cytoplasme. Ces RNP regroupent au sein des virions matures, les trois brins d'ARN associés chacun à de nombreuses copies de la protéine N et quelques copies de la protéine L, qui sont toutes les deux nécessaires à la transcription [91]. Ces structures sont caractéristiques des virus à ARN négatifs dont les génomes ne sont fonctionnels que sous une forme encapsidée et ne se sont jamais trouvés sous forme libre.

La première étape du cycle réplcatif est la transcription primaire qui est donc effectuée par le complexe de transcription associé aux RNP. Pour initier cette production d'ARNm, la transcriptase virale utilise des oligonucléotides amorces de 10 à 18 nucléotides de long provenant d'ARNm cellulaires qu'elle clive grâce à son activité exonucléasique. Cette stratégie est appelée « vol de coiffe » (« cap-snatching » en anglais). Chacun des ARNm issu des trois brins viraux possède une séquence 5' terminale (la coiffe) qui est reconnue par le complexe de transcription. En parallèle, la transcriptase permet également la synthèse des ARN complémentaires qui vont ensuite servir de matrice pour la réplication génomique et la synthèse de NSs. En effet, la particularité des *Phlebovirus* concerne la transcription et la traduction du brin S. Comme nous venons de le voir, l'ARN viral possède deux cadres ouverts de lecture chevauchant, qui codent l'un pour N et l'autre pour NSs. Cependant, la

synthèse de NSs nécessite d'abord la réplication complète et l'encapsidation du brin S en un ARN complémentaire dont la moitié 3'-terminale est ensuite transcrite en un ARNm « coiffé » en 5' et traduit pour donner NSs. Cela suggère que NSs ne soit pas impliquée dans les premières étapes de réplication du virus. Les travaux menés par Vialat et *al* sur le clone 13 vont d'ailleurs dans ce sens puisqu'ils ont montré que la délétion de 70% de la séquence codant pour NSs n'empêche pas la réplication sur certaines cellules de mammifères ou de moustiques, mais rend la souche non virulente chez la souris. Toutefois, cela est à nuancer du fait que le clone 13 a montré un titre infectieux extrêmement réduit sur cellules MRC-5 normalement permissives pour toutes les autres souches et utilisée pour le développement de la souche vaccinale MP 12. Cependant, la plupart des souches se répliquent sur une large gamme de types cellulaires et il est possible que dans certains cas NSs ne soit pas nécessaire[105].

Comme pour beaucoup d'autres virus, les dernières étapes de glycosylation des protéines et l'assemblage des particules virales se font au sein du Golgi puis l'ensemble est transporté dans des vésicules cytoplasmiques qui fusionnent avec la membrane cellulaire, permettant la libération des virions matures.

La réplication génomique a lieu après la synthèse des ARN complémentaires et pourrait dépendre de la présence de protéines N nouvellement synthétisées qui provoqueraient le basculement de la transcription vers la réplication. Un signal, encore indéfini, évite l'ajout d'une coiffe aux ARN complémentaires et permet leur encapsidation et la synthèse d'un ARNm pour NSs. Ainsi, la polymérase virale L pourrait, dans un premier temps avoir un rôle d'endonucléase pour cliver les ARNm cellulaires et générer les coiffes 5' puis dans un deuxième temps, elle orienterait son activité vers la réplication (figure n°3).

A. Transcription primaire

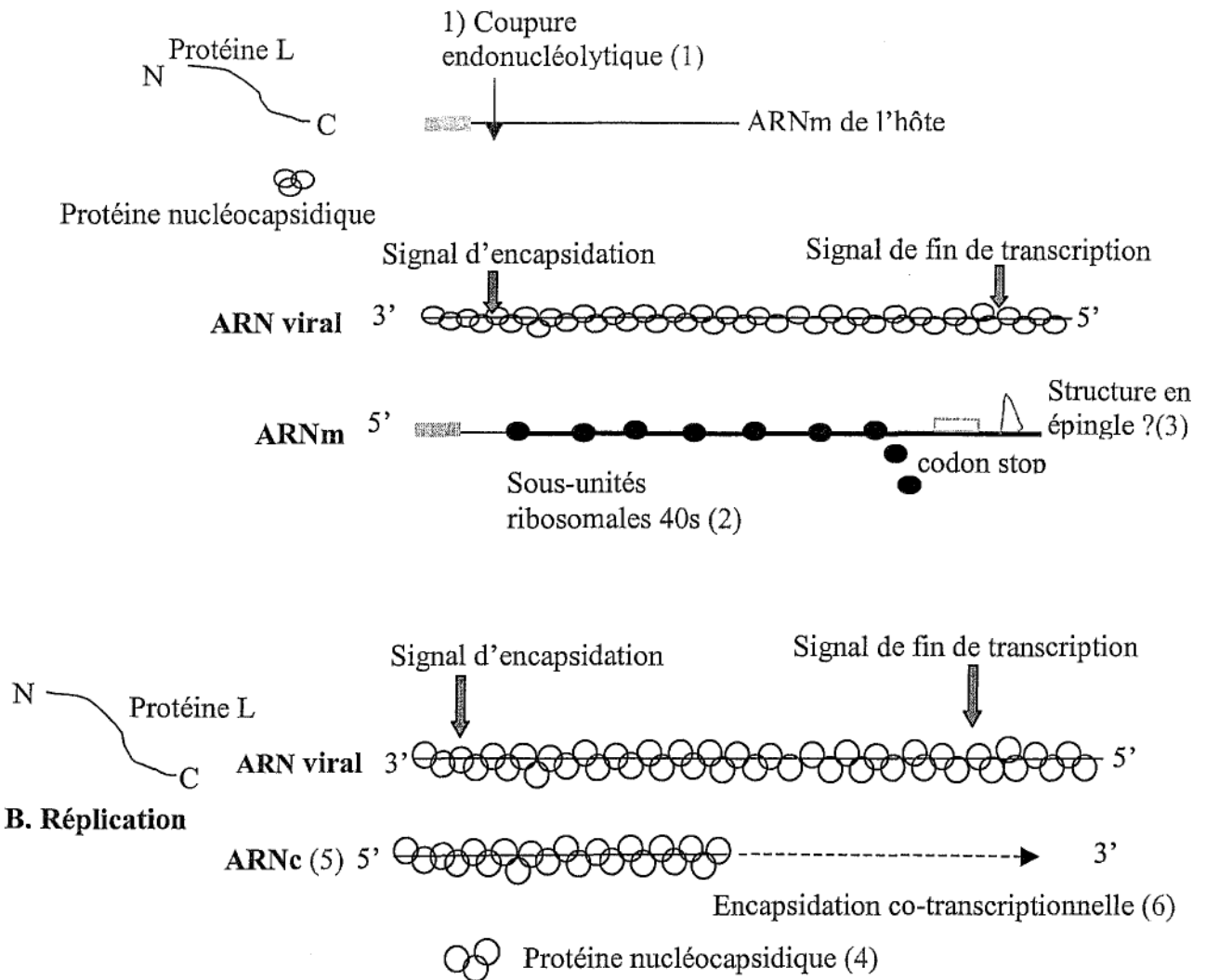


Figure n°3. Modèle de transcription et de réplication du virus RVFV. **A :** Pendant la transcription primaire, la protéine L associée aux virions infectieux, coupe les ARNm de la cellule hôte pour former une « coiffe »(1), et utilise ces oligonucléotides pour amorcer la transcription des ARN viraux encapsidés. Les ARNm viraux sont scannés par les sous-unités ribosomales 40S jusqu'au codon stop où ils quittent la matrice (2). La transcription est stoppée par une structure secondaire après ce codon stop (3) (épingle, « base-pairing » ?). Le signal d'encapsidation n'est pas reconnu sur les ARNm soit à cause des séquences nucléotidiques de l'hôte ajoutées, soit à cause des ribosomes. **B :** le basculement de la transcription vers la réplication pourrait dépendre de la présence de nouvelles protéines nucléocapsidiques (4). Les nouvelles copies de protéine L copient l'ARN viral pour former l'ARNc (5). Le signal d'encapsidation est reconnu et l'ARNc est complexé avec la protéine nucléocapsidique (6). Le signal de fin de transcription n'est pas reconnu, peut-être à cause de la protéine nucléocapsidique (d'après Schmaljohn 1996).

4.3. Phylogénie

Les études de variabilité génétique des différentes souches ont d'abord été basées sur des critères de séro-neutralisation ou de propriétés antigéniques des protéines virales, de pathogénicité pour la souris ou le rat ou des caractéristiques structurales. L'apport de la biologie moléculaire a permis d'affiner ces études à travers la cartographie des oligonucléotides clivés par la nucléase T1 ou la séquence de l'ARN à partir de l'ADNc. Aujourd'hui, on utilise plutôt la transcription inverse suivie de l'amplification génique et du séquençage des amplifiats. Cependant, cette meilleure précision a complexifié les tentatives de classification des différentes souches virales les unes par rapport aux autres et a donné lieu à des résultats parfois fortement différents selon la zone génomique utilisée pour la construction des arbres phylogénétiques.

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift, dont le génome est tri segmenté, est une parfaite illustration de ce paradoxe. En effet, cela permet l'existence de souches recombinantes à partir de souches classées dans des groupes (ou « clusters ») différents.

Le premier travail important de phylogénie réalisé par RT-PCR est celui de Sall et al [79]. Dans cette étude, 18 souches collectées sur une période de 38 ans dans différentes zones du continent Africain et chez différents hôtes ont été étudiées par amplification et séquençage de la région codant pour la protéine NSs. Cette région a été retenue parce qu'elle diffère au sein du genre *Phlebovirus* et qu'il existe une souche naturellement atténuée, clone 13, qui est déléetée de 70% de cette séquence, suggérant qu'elle puisse subir une forte pression de sélection.

Les résultats ont montré une divergence de 0 à 9,6% au niveau des nucléotides et de 0 à 9,5% au niveau des acides aminés. L'arbre phylogénique obtenu après alignement des séquences (601 pb) se divise en deux grandes branches. L'une est composée de souches

égyptiennes et l'autre, plus hétérogène, regroupe des souches subsahariennes. Cette dernière peut elle-même être divisée en deux branches dénommées Afrique de l'Ouest et Afrique Centrale et de l'Est.

Ces arbres permettent aussi d'étudier la progression du virus depuis sa mise en évidence au Kenya jusqu'à son extension hors du continent Africain [80, 83].

La même équipe s'est intéressée à l'existence de souches recombinantes à partir de souches appartenant à différentes branches [82]. Cette fois, en plus de NSs, ils ont séquencé les régions codant pour G2 (brin M) et L (brin L). L'analyse phylogénique a montré que pour chaque brin on retrouve bien les trois « clusters » décrits, mais certaines souches sont classées dans des « clusters » différents selon le brin qu'on considère. Cela suggère l'existence d'échanges génétiques entre les souches. De plus, il est intéressant de noter qu'il n'est pas possible de déterminer des groupes par rapport aux hôtes chez qui les souches ont été isolées. Ces résultats soulèvent aussi le risque d'apparition de virus chimériques virulents par recombinaison entre des souches virulentes et des souches vaccinales vivantes atténuées. C'est d'ailleurs cette hypothèse qui est proposée par Peters pour expliquer la réémergence du virus en Egypte en 1997 malgré une intense surveillance [69]. En 1990, Turell et al avaient déjà mis en évidence l'existence de virus recombinants chez l'animal et chez le moustique (*Culex pipiens*) co-infectés par des souches Égyptiennes et Sénégalaises. Chez le moustique, ces recombinants ont été obtenus indifféremment après ingestion de chacune des souches par piqûre de deux hamsters infectés chacun par une des souches, par piqûre d'un seul hamster co-infecté par les deux souches et après inoculation intra-thoracique des deux souches. Ces souches se sont également montrées capables de se répliquer chez le moustique et transmissibles au hamster [99].

Il faut également noter que, outre la recombinaison entre souches de RVFV, il existe une possibilité théorique d'émergence de souches associant des brins d'ARN provenant de

virus différents appartenant au genre des *Phlebovirus*. En effet, un travail récent a montré qu'il était possible de construire un système de transcription fonctionnel *in vitro* qui associe les brins synthétiques L et S de RVFV et le brin N du virus Toscana (TOSV), qui est un *Phlebovirus* neuropathogène pour l'homme. Cela suggère que des virus recombinants puissent être générés chaque fois que les deux virus infectent le même hôte [3].

II PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériels

1.1. Virus

La souche virale employée est la souche vaccinale vivante atténuée MP12 [12], aimablement fournie par le laboratoire des *Bunyaviridae* (Michèle Bouloy, Institut Pasteur de Paris), adaptée sur cellules Vero par plusieurs passages. Les titres infectieux viraux ont été déterminés par la méthode de la dose infectieuse en culture de tissus 50% (DICT₅₀) [77].

1.2. Cellules

Les cellules utilisées sont des cellules Vero (ATCC CCL-81), cellules de reins de singes verts [21]. Elles sont cultivées à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂, dans du milieu M199 (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) complémenté avec 100 UI.mL⁻¹ de pénicilline G, 0,1 mg.mL⁻¹ de streptomycine et 5% V/V de sérum de veau fœtal (SVF) (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Les cellules infectées par le RVFV sont maintenues à 37°C dans du M199.

1.3. Substances antivirales

Les substances antivirales testées au cours de cette étude et leur origine sont données dans le Tableau V. Ces composés ont été choisis parce qu'ils présentaient une activité

antivirale spécifique sur le virus de la fièvre à phlébotome, un autre virus du genre *Phlebovirus* [15].

Composés testés	Origine
6-azauridine	Sigma-Aldrich, S ^t Quentin-Fallavier, France
Suramine	Biomol, Le Perray-en-Yveline, France
Pentosan polysulphate	Sigma-Aldrich
Glycyrrhizine	Sigma-Aldrich
Dextran sulphate	Sigma-Aldrich
Fucoidan	Sigma-Aldrich
Ribavirine	Sigma-Aldrich
IFN α 2b	Schering-Plough, S ^t Quentin-Fallavier, France
IFN α 2a	Roche Diagnostic, Meylan, France

Tableau V. Substances antivirales criblées pour leur efficacité sur la réplication de RVFV et leur origine.

1.4. Sérums de souris

Des souris ont été infectées par différentes souches de RVFV par voie intrapéritonéale et des sérums prélevés à différents temps après infection, comme décrit dans la littérature [10].

1.5. Sérums humains

Nous avons utilisé des sérums humains qui ont été enrichis expérimentalement avec la souche MP12 de manière à obtenir un titre final de 10^3 , 10^4 ou 10^5 DICT₅₀.mL⁻¹.

2. Méthodes

2.1. Détermination des conditions expérimentales pour l'utilisation du RVFV

La souche virale utilisée dans cette étude a d'abord été titrée par la méthode des $DICT_{50}$ sur plaques de 96 puits. Cette méthode consiste à infecter 11 colonnes d'une plaque de 96 puits avec des dilutions successives de virus. Les dilutions sont soit d'ordre 10, soit d'ordre 4 et une douzième colonne sert de témoin cellulaire non infecté. A partir du quatrième jour post-infection, les cellules sont observées quotidiennement et chaque puits est comparé aux témoins cellulaires afin d'estimer la présence ou l'absence d'un effet cytopathogène (ECP) du virus présent par rapport à la morphologie normale des cellules. Lorsque cet ECP n'évolue plus d'un jour à l'autre, l'expérience est arrêtée. En fonction du nombre de puits présentant un ECP pour chacune des dilutions et du volume d'inoculation, il est possible d'exprimer un titre infectieux en doses infectieuses en culture de cellules 50% ($DICT_{50}$).

Dans un deuxième temps, il a été déterminé la dilution de cette suspension virale utilisée pour le criblage des substances antivirales. Il s'agit de la dilution maximale qui donne 100% d'effet cytopathogène (ECP), 4 jours après l'infection des cellules Vero.

2.2. Evaluation de l'activité antivirale et de la cytotoxicité des substances choisies

Les cellules Vero sont cultivées sur plaques de 96 puits, jusqu'à confluence. Le milieu de culture est alors éliminé et les cellules lavées 1 fois avec du milieu M199. Ensuite, 100 μ L

de suspension virale (multiplicité d'infection de 0,1 DICT₅₀/cellule) et 100 µL de milieu contenant une concentration déterminée de substance antivirale sont ajoutés en utilisant 8 puits par concentration. Huit puits sont utilisés comme témoins virus (cellules infectées mais non traitées) et 8 autres comme témoins cellulaires (cellules non infectées et non traitées). Après 4 jours d'incubation, lorsque 100% d'ECP sont observés dans les puits témoins virus, le pourcentage d'ECP est estimé dans tous les autres puits. L'activité antivirale est exprimée en dose efficace 50% (DE₅₀), qui est la concentration du composé requise pour inhiber 50% de l'ECP par rapport aux témoins virus.

En parallèle, la cytotoxicité des composés testés est estimée en utilisant des cellules non infectées (8 puits par concentration). La détermination de la concentration de substance antivirale entraînant la réduction de la viabilité des cellules de 50% par rapport aux témoins cellulaires permet de déterminer la dose cytotoxique 50% (DC₅₀). L'index de sélectivité est donné par la valeur du rapport DC₅₀/DE₅₀.

2.3. *Mesure de la réduction des titres infectieux viraux*

Pour les composés antiviraux ayant un index de sélectivité >3 et utilisables en clinique humaine (données de littérature), l'effet inhibiteur sur la multiplication virale a été étudié plus en avant. Des cellules Vero sont cultivées en plaque de 24 puits jusqu'à confluence. Le milieu est alors éliminé et 100 µL de suspension virale diluée, soit 0,01 DICT₅₀ par cellule et 2 mL de milieu contenant le composé testé à la concentration adéquate sont ajoutés (4 puits par concentration). Pour chaque substance antivirale, 4 puits sont utilisés comme contrôles (cellules infectées mais non traitées). Après 40 h d'incubation (durée propre à cette souche virale pour atteindre le titre infectieux maximal avant l'apparition de l'ECP), le milieu est éliminé, et 2 ml de M199 sont ajoutés. Les virions intracellulaires sont ensuite libérés par 3

cycles successifs de congélation à -80°C et décongélation à 45°C . Les surnageants homogénéisés de chaque puits sont utilisés pour la détermination du titre infectieux de chaque puits.

2.4. Extraction des ARN viraux

2.4.1. Extraction des échantillons cellulaires

Les échantillons ont été extraits par le mélange phénol/chloroforme (kit RNA instapur, Eurogentec, Belgique) en suivant les recommandations du fabricant : 200 μL de surnageant sont mis en contact avec 200 μL de tampon de lyse RNA instapur qui contient le phénol. Après mélange, 20 μL de chloroforme sont ajoutés, l'ensemble est vortexé pendant 15 sec puis disposé dans de la glace 5 min. Après centrifugation 15 min à 12000 g à 4°C , la phase aqueuse supérieure est récupérée et mélangée avec 300 μL d'isopropanol puis incubée 15 min à -20°C pour précipitation. Après centrifugation 15 min à 12000 g et 4°C , le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Dans un dernier temps, le culot est séché puis repris par 50 μL d'eau sans RNAses et éventuellement incubé quelques minutes à 45°C pour faciliter la dissolution de l'ARN. Chaque série d'extraction inclut un témoin négatif obtenu par lyse de cellules non infectées et cultivées dans les mêmes conditions que les cellules infectées.

2.4.2. Extraction des sérums animaux

Les acides nucléiques des souris virémiques ont été extraits par une méthode Trizol en suivant les recommandations du fabricant (Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France).

2.4.3. Extraction des sérums humains

140 μ L de sérum ont été extraits sur colonne de silice avec le kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'élution a été réalisée dans 60 μ L de tampon.

2.5. Amplification génique des ARN extraits

L'amplification des échantillons extraits a été réalisée en deux étapes : une étape de transcription inverse (RT) puis une étape d'amplification proprement dite. Au préalable, il a été nécessaire d'établir un protocole expérimental, c'est à dire :

- choisir une zone à amplifier et les amorces permettant cette amplification ;
- déterminer les conditions expérimentales de la RT (température, durée, mélange réactionnel) ;
- déterminer les conditions expérimentales de la PCR (température, durée, mélange réactionnel).

2.5.1. Choix de la zone d'amplification

La littérature nous a permis de recenser l'ensemble des souches de RVFV pour lesquelles tout ou une partie du génome a été séquencée. Dans ce domaine, le travail le plus exhaustif est celui publié en 1997 par Sall et *al* qui a étudié la variabilité de la séquence codant pour la protéine NSs [79]. De plus, un travail de Muller et *al* publié en 1995 a également porté sur la même zone et abouti notamment au développement de plusieurs amorces d'amplification [61].

Nous avons donc choisi d'aligner toutes les séquences de NSs recensées dans la banque de données GenBank (tableau VI) et choisi ensuite les amorces optimales, soit celles

déjà publiées soit d'autres originales. Ces séquences ont été alignées avec le logiciel DNAsis® (DNAsis 2.6, Hitachi Software Engineering, Olivet, France) et les amorces ont été choisies avec le logiciel Primer Premier® (Primer Premier V 4.04, Premier Biosoft International, Palo Alto, USA) et synthétisées par la société Gibco BRL (Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France).

2.5.2. Choix des amorces d'amplification

Tous les couples d'amorces retenus ont d'abord été testés par RT-PCR conventionnelle suivi d'une révélation sur gel pour vérifier la qualité de l'amplification et la présence éventuelle d'amplification non spécifique ou de dimères.

2.5.3. Choix des conditions expérimentales de la transcription inverse

Pour toutes les RT, 10 µL d'ARN viral extrait ont été ajoutés à 6µL du tampon de RT, 2 µL de DTT 0,1 M, 2,5 µL d'un mélange des 4 dNTP 2,5 mM (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), 1 µL d'un inhibiteur des RNases (Promega France, Charbonnières, France), 2,5 µL de l'amorce sens 10 µM et une solution stérile de glycogène 20 mg.mL⁻¹ pour un volume final de 29 µL.

Après dénaturation des ARNs 30 s à 95°C, 1 µL d'enzyme MMLV-RT (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) a été ajouté à chaque échantillon et les ADNc ont été synthétisés à 37°C 1 h suivi d'une dénaturation de l'enzyme à 95°C 10 min. Dans toutes les séries de RT est inclu un témoin négatif dans lequel l'ARN a été remplacé par de l'eau.

Nous avons testé l'influence de la présence ou de l'absence de glycogène dans le mélange réactionnel et l'amorce utilisée (sens ou anti-sens).

Souche	N° d'accès GenBank	Longueur séquencée (paires de bases)	Référence
ZH548	Y12756	602	[92]
MP12 ^a	Y12754	602	[92]
H Eg93	Y12751	602	[92]
H D47502	Y12750	602	[92]
H D47408	Y12749	602	[92]
H D47311	Y12748	602	[92]
B Eg93	Y12747	602	[92]
Ar Mg990	Y12746	601	[92]
Ar Mg811	Y12745	601	[92]
Ar D38661	Y12744	601	[92]
Ar D38457	Y12743	601	[92]
Ar D104769	Y12742	601	[92]
Ar B1976	Y12741	601	[92]
An D106417	Y12739	601	[92]
MP12 ^a	X53771	1690 ^b	[46]

Tableau VI. Origine des séquences de NSs des différentes souches de RVFV utilisées pour l'alignement et le choix des amorces d'amplification et de la sonde fluorogénique.

^a La souche atténuée MP12 a été obtenue à partir de la souche virulente ZH 548.

^b Dans cette étude, le brin S a été séquencé dans son intégralité.

2.5.4. Choix des conditions de PCR

PCR conventionnelle

Dans ce cas, 10 µL d'ADNc ont été ajoutés à 10 µL de tampon, 3 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL d'un mélange de dNTPs 10 mM (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), 2,5 µL de chaque amorce 10 µM, 0,5 µL de *Taq* polymérase (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) et 69,5 µL d'eau stérile pour un volume final de 100 µL.

Les échantillons sont ensuite soumis à 35 cycles d'amplification avec 1 min de dénaturation à 95°C, 1 min d'hybridation à une température dépendante du couple choisi et 1 min d'élongation à 72°C. Ces 35 cycles sont suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Le thermocycler utilisé est un PE 2400. Chaque série de réaction inclut un témoin négatif dans lequel l'ADNc est remplacé par un volume égal d'eau ultra pure.

PCR en temps réel

Avec un intercalant fluorescent (SYBR Green®)

Les échantillons utilisés pour la quantification ont été amplifiés sur un appareil de type LightCycler® (Roche diagnostic, Meylan, France) qui permet un suivi en temps réel de la cinétique de réaction et l'analyse des courbes de fusion des produits amplifiés.

Pour l'amplification, 2 µL d'ADNc sont ajoutés dans un capillaire en verre à un mélange contenant 1 µL de chaque amorce à 10 µM, de 1,6 à 2,4 µL de MgCl₂ 50 mM selon la concentration finale attendue (3-4 mM), de l'eau stérile pour un volume final de 20 µL et 2 µL d'un mélange incluant d'une part l'enzyme *Taq* polymérase modifiée et d'autre part le fluorophore (FastStart DNA Master SYBR Green® I, Roche diagnostic, Meylan, France).

Le SYBR Green® est une molécule qui s'intercale de manière irréversible dans l'ADN double brin. Excitée à 495 nm, elle émet à 520-530 nm et cette fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans le milieu. Après une étape de dénaturation à chaud (Hot Start) destinée à activer la polymérase, les échantillons subissent 45 cycles d'amplification : 15 s de dénaturation à 95°C, 6 s d'hybridation à 51°C et 12 s d'élongation à 72°C. A chaque fin d'élongation, l'appareil réalise une mesure de la fluorescence émise par le SYBR Green®. Pendant la dénaturation, tout l'ADN est sous forme simple brin et la fluorescence émise est quasiment nulle (Figure n°4a). Durant l'hybridation, les amorces se

fixent à la séquence cible, entraînant la formation de petits morceaux d'ADN double brin où le SYBR Green® est intercalé, ce qui augmente la fluorescence (Figure n°4b). A la phase d'élongation, les doubles brins d'ADN se forment en quantité plus importante et à la fin de cette étape la fluorescence est théoriquement maximale (Figure n°4c et n°4d). De cette façon, à la fin de chaque cycle, il est possible de visualiser en temps réel la quantité d'ADN amplifié (sans toutefois pouvoir juger s'il s'agit du produit d'amplification attendu). Dans une dernière étape, après les cycles d'amplification, les échantillons sont réhybridés à 61°C puis lentement dénaturés jusqu'à 95°C. Pendant cette dernière opération, la fluorescence décroît au fur et à mesure de la déshybridation des ADN double brin. La mesure continue qui est réalisée permet ensuite de prévoir la température de fusion du produit amplifié (T_m), qui lui est propre et qui permet ensuite son identification [22].

Ces techniques combinées de PCR en temps réel et d'utilisation d'un intercalant présentent plusieurs avantages : utilisation de faibles volumes réactionnels, réalisation d'une PCR en moins de 45 min, suivi en temps réel de sa cinétique et possibilité de quantification de l'échantillon. La détermination de la température de fusion est une étape préalable d'identification.

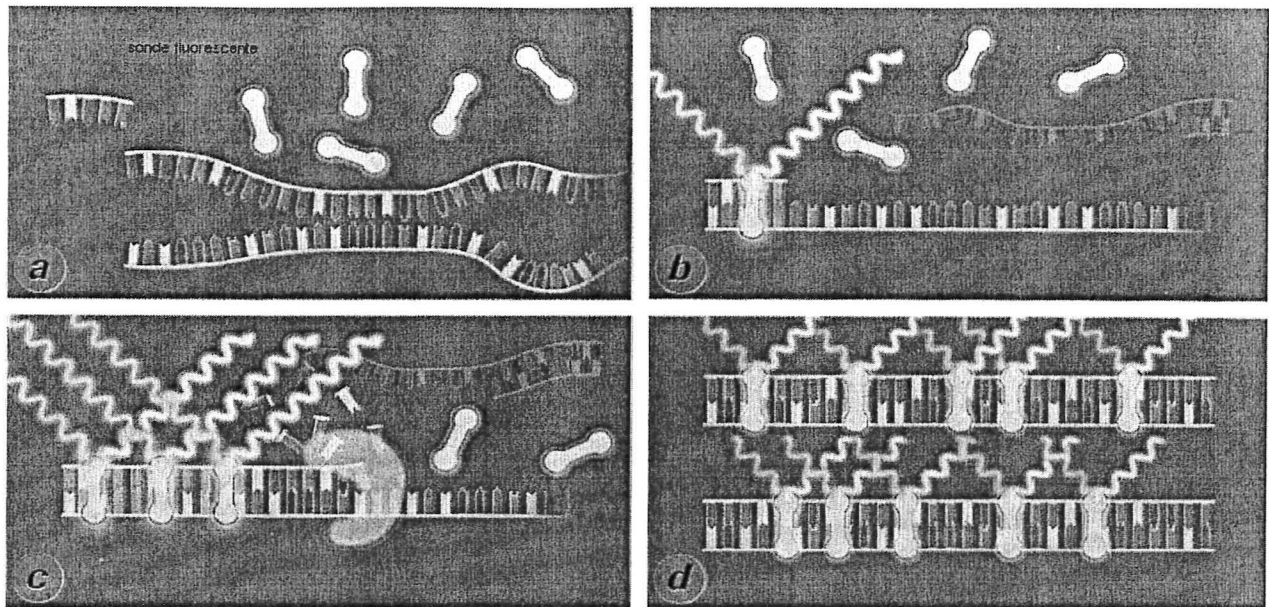


Figure n°4. Utilisation du SYBR Green®. Représentation schématique de chaque étape d'amplification et de la fluorescence émise à la dénaturation (a), l'hybridation (b), en début puis en fin d'élongation (c et d).

Sonde d'hydrolyse (chimie TaqMan®)

Un autre procédé de quantification consiste à employer une sonde de type TaqMan® en plus des deux amorces de PCR. L'extrémité 5' de cette sonde est marquée avec un marqueur fluorescent « reporter », dont le spectre d'émission est absorbé par un second fluorophore (« quencher ») à travers un phénomène de FRET (transfert d'énergie par résonance Förster) (figure n°5a). Au cours de l'étape d'élongation de la PCR, la sonde est clivée par la polymérase (figure n°5b et n°5c), le fluorophore « reporter » est détaché du « quencher » et le signal est émis (figure n°5d). A chaque cycle, de nouvelles molécules sont libérées à leur tour dans le milieu et la fluorescence mesurée s'accroît d'autant. De par le fait que la fluorescence ne provient que des sondes qui se sont accrochées spécifiquement entre les amorces et qui ont été clivées, l'étape de détermination des courbes de fusion n'est plus

nécessaire. Le protocole expérimental diffère de celui du SYBR Green® de par le fait que chaque cycle de PCR est réduit à une étape de dénaturation à 95°C 15 sec et une étape regroupant l'hybridation des amorces et de la sonde et l'élongation à 60°C 1 min., au cours de laquelle la sonde est hydrolysée. La fluorescence émise est mesurée à l'issue de cette étape. La sonde est directement ajoutée dans le mélange réactionnel contenant l'enzyme (FastStart DNA Master Hybridization Probes, Roche Diagnostic, Meylan, France) à une concentration de 0,5 µM.

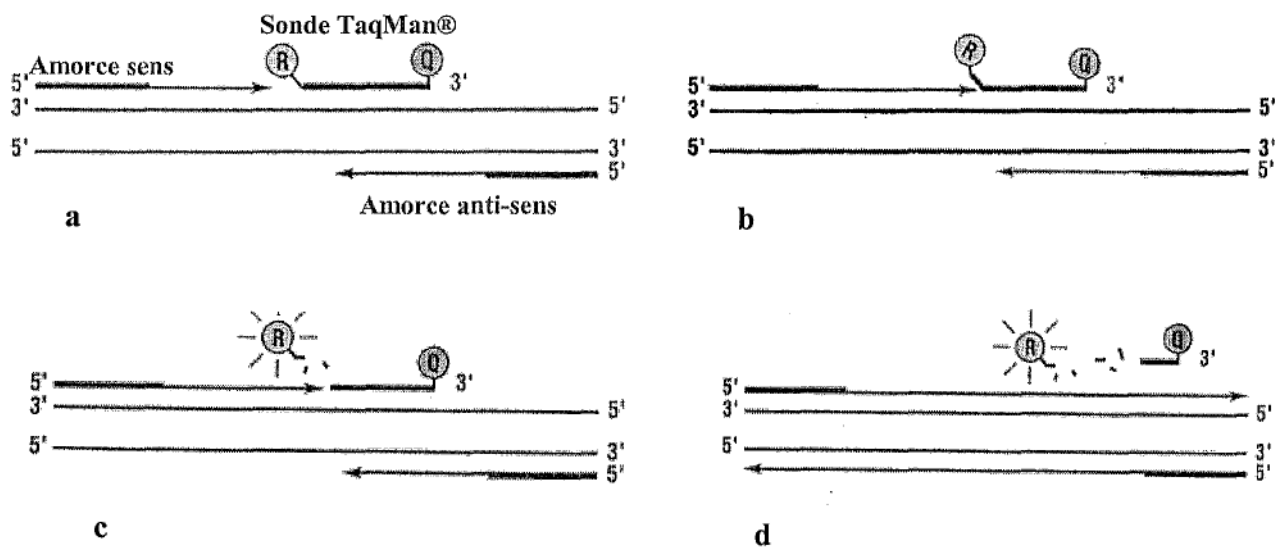


Figure n°5. Utilisation d'une sonde TaqMan®. Représentation schématique des différentes étapes. La sonde s'hybride sur sa cible, au sein de la zone amplifiée par les amorces (a). Lors de l'élongation, si la sonde est présente, elle est hydrolysée par l'enzyme d'élongation (b et c). Cela entraîne la libération du fluorophore « reporter » et la suppression du phénomène de « quenching », ce qui permet la lecture du signal de fluorescence (d).

Pour la mise au point, nous avons testé différentes conditions expérimentales en variant :

- La concentration de $MgCl_2$, co-facteur de l'enzyme de PCR ;
- La concentration de chacune des amorces ;
- La concentration de sonde.

Révélation des produits d'amplification

Les produits d'amplification de RT-PCR conventionnelle et de RT-PCR en temps réel ont été révélés par migration sur gel d'agarose à 2%, incubation dans du bromure d'éthidium (BET) et observation sous lampe UV. Un marqueur de poids moléculaire déposé en même temps a permis de vérifier la présence du produit attendu.

2.6. Choix d'un standard de quantification

Pour pouvoir réaliser la quantification de l'ARN viral extrait soit de cellules soit de sérums, il est nécessaire de disposer d'un étalon qui sera quantifié dans les mêmes conditions que les échantillons mais dont la quantification est réalisée par une autre méthode, qui est validée. Un des moyens utilisables consiste à fabriquer un plasmide dans lequel on insère la séquence qui est amplifiée au sein du génome viral. Ce plasmide est ensuite transcrit en ARN puis quantifié par spectrophotométrie. Cette quantité est rapportée à la taille du fragment transcrit et permet de déterminer la concentration d'ARN plasmidique en nombre de copies.mL⁻¹.

Ensuite, pour chaque expérience, plusieurs dilutions d'ARN plasmidique sont amplifiées en parallèle des échantillons et servent pour tracer une droite d'étalonnage. Les

résultats des échantillons sont rapportés à cette droite et donnent une quantité en nombre de copies.mL⁻¹. Il est évident que cette quantité est toujours à rapporter au référentiel utilisé. De plus, ce système ne permet pas de déterminer un nombre absolu de particules virales infectieuses. En effet, on ne quantifie qu'un segment du brin S. Ce qui veut dire qu'on ne prend pas en considération le fait que RVFV soit tri-segmenté et que la représentativité des trois différents brins ne soit pas la même au sein des virions. De plus, on quantifie aussi l'ARN des particules défectives ou l'ARN éventuellement libre.

2.6.1. Construction du plasmide

Un plasmide contenant le gène NSs du RVFV souche MP12 cloné au site *Sma*I de pGem4Z (Proméga France, Charbonnières, France) et sous contrôle du promoteur de la T7 ARN polymérase, a été construit à l'Institut Pasteur de Paris (Michèle Bouloy, laboratoire des *Bunyaviridae*). La figure n°6 présente la carte du plasmide avec les différents sites potentiels d'insertion d'une séquence d'intérêt ainsi que les gènes de résistance et de sélection.

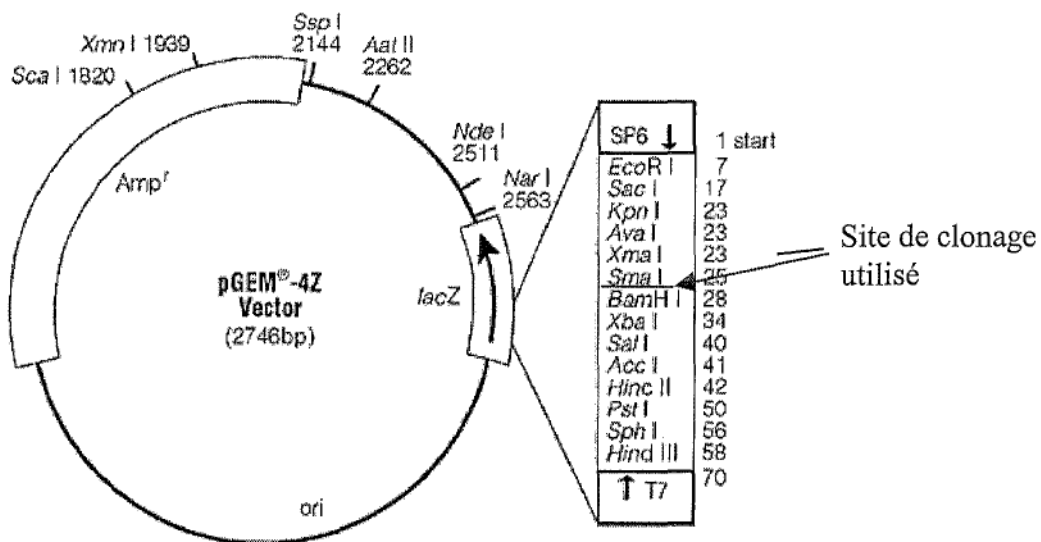


Figure n°6. Carte du plasmide pGEM utilisé comme vecteur pour exprimer l'ARN codant pour la protéine NSs de la souche MP12.

2.6.2. Transcription de l'ARN plasmidique

La transcription du plasmide comprend plusieurs étapes :

Linéarisation

Environ 8 μg de plasmide sont mélangés avec l'enzyme de linéarisation, ici *HindIII*. L'ensemble est ensuite incubé 1h30 au bain-marie à 37°C. Pour vérifier l'efficacité de la digestion, on fait migrer en parallèle sur un gel d'agarose 1%, le plasmide digéré et le plasmide non digéré. La forme enroulée ou super enroulée du plasmide circulaire fait qu'il ne migrera pas comme le plasmide digéré.

Purification

Le mélange réactionnel est ensuite purifié sur colonne de silice (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) afin d'éliminer le tampon et l'enzyme.

Transcription

Environ 2 μg de plasmide linéaire sont mis en contact avec un mélange contenant un mélange des 4 NTPs 2,5 mM (Proméga France, Charbonnières, France), 10 μL de DTT 100 mM, 120 UI d'un inhibiteur des RNAses (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), 20 μL du tampon de l'enzyme, 2 μL de l'enzyme T7 RNA polymérase (Proméga France, Charbonnières, France) et de l'eau stérile pour un volume final de 100 μL . L'ensemble est incubé 1h30 au bain-marie à 37°C puis on rajoute une même quantité d'enzyme et l'incubation est répétée.

Traitement à la Dnase

Cette étape a pour but d'éliminer au maximum la matrice plasmidique d'ADN double brin qui a servi à la transcription et qui pourrait contaminer l'amplification. Pour cela, le mélange réactionnel de transcription est mis en contact avec une quantité en excès de Dnase I et du MgCl₂ pour une concentration finale de 5 mM. L'ensemble est incubé 25 min au bain-marie à 37°C puis la même quantité d'enzyme est ajoutée et le mélange de nouveau incubé dans les mêmes conditions.

La dernière étape consiste à purifier l'ARN ainsi produit par un traitement phénol/chloroforme suivi d'une précipitation alcoolique. Pour cela, on ajoute un volume d'un mélange phénol/chloroforme équilibré pH 8. L'ensemble est mélangé par retournement puis centrifugé 5 min à 12000g. La phase aqueuse supérieure est récupérée et un volume d'isopropanol est ajouté. Le mélange est incubé 20 min à -20°C pour précipiter les acides nucléiques. Après centrifugation 15 min à 12000 g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot et lavé avec 1 mL d'éthanol 70%. Après centrifugation 10 min à 12000 g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est séché sous hotte pendant 10 min puis resuspendu dans de l'eau DEPC. Il est parfois nécessaire d'incuber l'ARN quelques minutes à 42°C pour faciliter la mise en suspension.

Pour contrôler l'efficacité de la digestion de l'ADN, l'échantillon traité est soumis en parallèle à une RT-PCR et à une PCR seule avec révélation sur gel comme décrit précédemment afin de pouvoir distinguer l'amplification de l'ARN (RT-PCR) de celle de l'ADN résiduel. Le traitement à la DNase I ainsi que la purification sont répétés autant de fois qu'il est nécessaire pour que sur le gel de révélation, le « spot » correspondant à l'échantillon soumis à la PCR seul soit suffisamment faible pour être négligé.

Quantification de l'ARN plasmidique

Avant utilisation, l'ARN plasmidique est quantifié par spectrophotométrie. On mesure sa densité optique à 260 et à 280 nm, ce qui permet de connaître sa concentration (DO_{260}) et sa pureté (DO_{260}/DO_{280} qui doit être supérieure à 1,9). On peut ensuite calculer une concentration en nombre de copies en se référant à la longueur du fragment d'ARN transcrit.

2.7. Evaluation du potentiel d'utilisation diagnostique de la RT-PCR en temps réel

Nous avons souhaité évaluer la possibilité d'utiliser la méthode de détection et de quantification en temps réel pour le diagnostic animal ou humain d'une infection par le RVFV. Pour cela, le RVFV contenu dans des sérums de souris infectées a été quantifié et le résultat a été comparé avec le calcul du titre infectieux du RVFV contenu dans des sérums en culture de cellules et exprimés en $PFU.mL^{-1}$.

Dans un deuxième temps, les sérums humains expérimentalement enrichis en RVFV souche MP12 ont également été quantifiés et les résultats comparés aux titres infectieux initiaux.

3. Résultats

3.1. Détermination des conditions expérimentales pour l'utilisation du RVFV

La dilution de virus retenue pour les expériences est la dilution au 1/3000^{ème} à partir d'une suspension de virus à 10⁶ DICT₅₀/mL, qui est celle donnant 100% d'ECP lors de la lecture à 4 jours après infection (J₄). L'avantage de la lecture à J₄ est de ne pas avoir à ajouter de sérum de veau fœtal alors qu'il est nécessaire de le faire si la lecture est réalisée plus tardivement.

3.2. Evaluation de l'activité antivirale et de la cytotoxicité des substances choisies

Les 9 composés présentés ci-dessus ont été testés en parallèle et pour chacun d'entre eux, nous avons déterminé la DE₅₀ et la DC₅₀. Ces valeurs ont ensuite servi à calculer l'indice de sélectivité par la valeur du rapport DC₅₀/DE₅₀. Le tableau VII montre les résultats obtenus pour les substances les plus intéressantes.

Pour 4 des substances, la cytotoxicité s'est montrée trop importante pour que l'index sélectif (IS) puisse être calculé. Il s'agit des 3 carrageenan et de la suramine. Pour les autres substances, les IS varient entre 3,7 et 251. Nous avons choisi de ne sélectionner à l'issue de ce criblage, que les substances antivirales présentant un IS > 3 et utilisable en clinique chez l'homme. Il s'agit de la ribavirine et de l'IFN α , qui sont notamment utilisés en bi-thérapie

contre le VHC, de la 6-azauridine et de la glycyrrhizine qui a été aussi utilisée dans le traitement des hépatites chroniques de type C.

Molécule antivirale	DC ₅₀ ^a (µg/ml ou UI/ml)	DE ₅₀ ^b (µg/ml ou UI/ml)	Index de sélectivité (DC ₅₀ /DE ₅₀)
IFNα2a	>10000	57,8	>170
IFNα2b	>10000	43,2	>230
Ribavirine	7500	29,9	251
6-Azauridine	51	0,22	232
Dextran sulfate	1630	181,2	8,9
Glycyrrhizine	3125	848	3,7
Pentosan sulfate	>1000	109,3	>9,1
Fucoidan	1290	68,8	18,7

Tableau VII. Cytotoxicité, activité antivirale et index de sélectivité des substances actives sur RVFV *in vitro* et ayant un index de sélectivité >3.

a. Dose cytotoxique 50%.

b. Dose efficace 50%.

3.4. Réduction du titre infectieux sous l'effet des substances antivirales

La figure n°7 montre les résultats obtenus avec les 4 substances antivirales retenues. Pour la ribavirine, l'IFNα et la 6-azauridine, le titre infectieux en culture de cellules diminue avec l'augmentation de la concentration du composé utilisé. De plus, cette décroissance est statistiquement dose dépendante (test ANOVA, p<0,005). Par contre, pour la glycyrrhizine,

les concentrations les plus faibles sont inefficaces sur la réplication virale et seules les concentrations les plus importantes présentent une efficacité, avec effet seuil.

Aux doses non cytotoxiques les plus fortes, la réduction du titre infectieux en culture de cellule en présence de ribavirine, d'IFN α , de 6-azauridine ou de glycyrrhizine est respectivement >4.6 log, de 4,4 log, >4.5 log et >4.1 log DICT₅₀/mL par rapport à un témoin cellulaire infecté non traité.

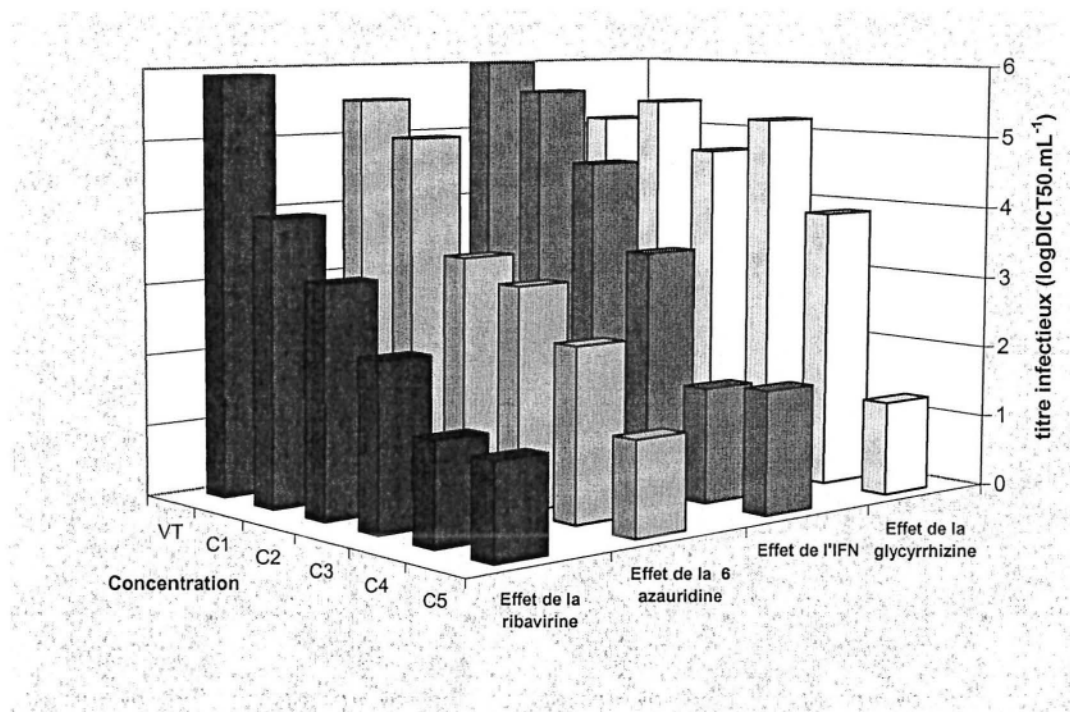


Figure n°7. Réduction du titre infectieux du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* en présence de concentrations croissantes de différentes substances antivirales (de C1 à C5). VT représente le virus non traité et sert de référence. Les concentrations utilisées figurent dans le tableau X.

3.5. Quantification en temps réel

3.5.1. Choix du couple d'amplification

La première étape a consisté à choisir des amorces d'amplification en RT-PCR conventionnelle révélée sur gel d'agarose. Le tableau VIII montre les amorces testées ainsi que la taille du fragment attendu et la présence éventuelle de dimères mis en évidence sur gel. Au terme de cette étape, nous avons retenu le couple *S432* (amorce sens) et *NS3m* (amorce anti-sens). L'amorce *NS3m* a été obtenue par modification de l'amorce *NS3* [61].

Nous avons également vérifié l'efficacité du couple retenu sur Light Cycler® en présence de SYBR Green®. Nous avons ainsi pu déterminer la température de fusion du produit amplifié (T_m) et s'assurer de l'absence d'amplification non spécifique. La figure n°8 montre l'aspect de la courbe de fusion obtenue avec le T_m du produit spécifique et celui des dimères d'amorces.

Amorce	Séquence 5'-3'	Sens	Taille du produit amplifié avec NS3modifiée (pb)
S525	GGATGATAGCGACTGAGG	Sens	205
S470	ATGAGGAGTTGCAAGATC	Sens	260
S432	ATGATGACATTAGAAGGGA	Sens	298
NS3modifiée	ATGCTGGGAAGTGATGAG	Anti-sens	

Tableau VIII. Séquences des amorces d'amplification utilisées testées lors du choix du protocole d'amplification en temps réel du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*.

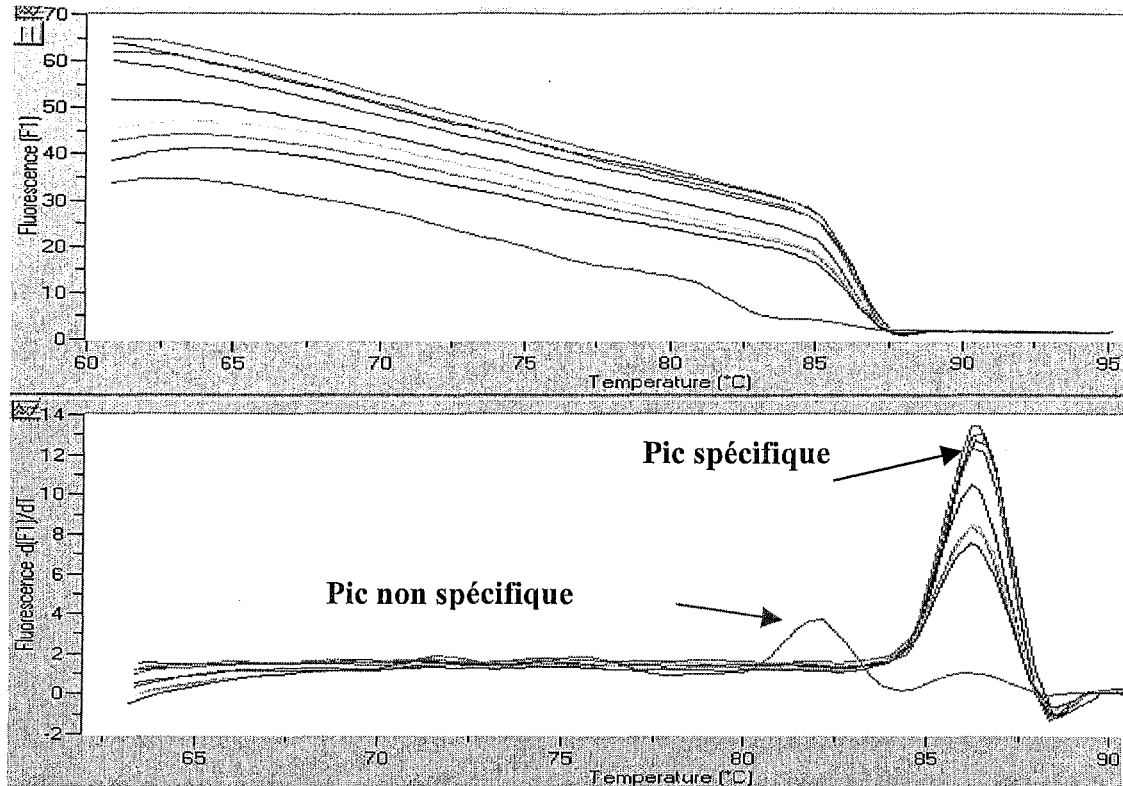


Figure n°8. Exemple de résultats obtenus par amplification par RT-PCR sur Light Cycler® de différentes concentrations d'ARN plasmidique du RVFV, en utilisant le SYBR Green comme agent intercalant. En haut, figure la décroissance du signal de fluorescence lors de la dernière étape de déshybridation par augmentation progressive de la température. En bas, figure la courbe de fusion des différents produits amplifiés, avec leur T_m respectives. Le pic spécifique correspond au produit d'amplification attendu et le non spécifique correspond ici aux dimères d'amorces. Ce résultat a été vérifié sur gel d'agarose.

3.5.2. Choix d'une sonde d'hydrolyse

L'utilisation des alignements de séquences décrits et les séquences des amorces retenues a permis le choix d'une amorce de type TaqMan®, *CRSSAr* (5'C6-Fam-ATT GAC CTG TGC CTG TTG CC-Tamra 3') marquée par deux fluorophores.

3.5.3. Optimisation de la RT-PCR en temps réel

Sensibilité et linéarité

Les premières expériences ont été conduites en utilisant l'ARN plasmidique transcrit et quantifié. L'ajout de glycogène dans le mélange réactionnel a permis d'améliorer nettement la linéarité de la méthode et d'augmenter la sensibilité. Nous avons également comparé les résultats de l'amplification en fonction de l'amorce employée (sens ou anti-sens). L'utilisation de l'amorce anti-sens pour la RT permet aussi une amplification, mais le rendement est environ 100 fois plus faible après examen des résultats obtenus sur Light Cycler® (résultats non montrés).

Cette étape a permis de déterminer une sensibilité aux alentours de 50-100 copies d'ARN par prise d'essai et de vérifier la linéarité de la méthode sur 5 logarithmes de copies d'ARN (figure n°9). Nous avons également choisi les conditions expérimentales optimales, à savoir une concentration de 500 nM pour les amorces et la sonde fluorogénique et une concentration finale de 3,5 mM de MgCl₂.

Une deuxième étape a consisté à reproduire le protocole défini préalablement sur un ARN synthétique, sur de l'ARN viral extrait de cellules Vero infectées. La figure n°10 montre les résultats obtenus. La méthode de quantification est linéaire sur 5 log DICT₅₀. mL⁻¹ et le seuil de sensibilité a été fixé à 1 log DICT₅₀.mL⁻¹.

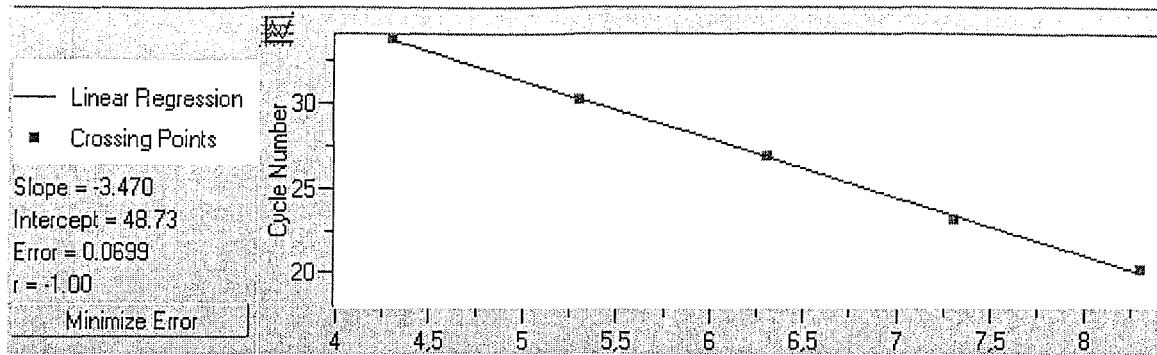


Figure n°9. Courbe standard obtenue après quantification en temps réel de dilutions d'ARN synthétique du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*. Les valeurs des C_T sont tracées avec les quantités d'ARN exprimées en nombre de copies.

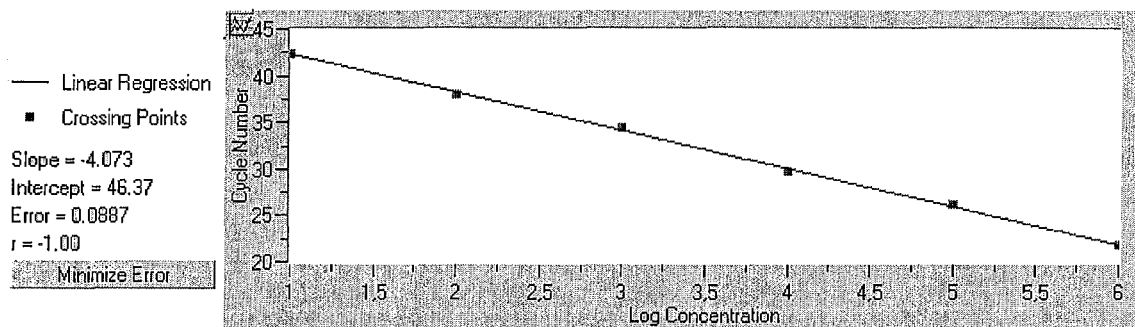


Figure n°10. Courbe standard obtenue après quantification en temps réel de dilutions d'ARN viral extrait de cellules Vero infectées par le *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*. Les valeurs des C_T sont tracées avec les valeurs des titres infectieux qui vont de 10^6 à 10^0 log DICT₅₀.mL⁻¹

Spécificité

Pour s'assurer de la spécificité de la méthode d'amplification vis à vis du RVFV, nous avons vérifié qu'elle détectait des souches issues des différents clusters de RVFV. Ensuite, nous avons vérifié l'absence d'amplification non spécifique d'une part d'ARN extraits d'autres virus appartenant au genre *Phlebovirus* et proches de RVFV (tableau IX) et d'autre part d'ARN extraits de cellules non infectées. Les résultats ont montré que des souches virales appartenant à différents « clusters » de RVFV sont toutes détectées, mais que ni les ARN de virus du même genre, ni les acides nucléiques extraits de cellules non infectées (Vero et AP61) ne permettent une amplification non spécifique qui pourrait donner lieu à de faux positifs.

Nom du virus	Souche	Cluster
<i>Virus de la fièvre de la Vallée du Rift</i>	MP12	Egypte
<i>Virus de la fièvre de la Vallée du Rift</i>	ZH548	Egypte
<i>Virus de la fièvre de la Vallée du Rift</i>	ARD 33.4	Egypte*
<i>Virus de la fièvre de la Vallée du Rift</i>	ZH501	Egypte
<i>Virus de la fièvre de la Vallée du Rift</i>	348-97;1	Afrique de l'Est et Afrique centrale
Toscana	Toscana	
Icoaraci	Icoaraci	
Belteria	Belteria	

Tableau IX. Souches virales sur lesquelles a été testée la méthode de détection par RT-PCR en temps réel. Il s'agit soit de souches de *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*, soit d'autres virus appartenant au genre *Phlebovirus*.

* Cette souche est classée dans le cluster Egypte pour le brin S et Afrique de l'Ouest pour les deux autres brins.

3.6. Quantification des échantillons traités. Comparaison avec la méthode de référence

Nous avons utilisé le protocole de quantification en temps réel pour quantifier l'ARN viral extrait des échantillons cellulaires traités par l'une des 4 substances antivirales retenues et préalablement titrés par la méthode de référence en culture de cellules. Pour pouvoir établir une comparaison avec les résultats de la méthode de réduction du titre infectieux en culture de cellules, nous avons choisi de désigner par l'expression « titre génomique » la quantité d'ARN viral détectée par RT-PCR en temps réel dans les échantillons traités.

Comme le montrent la figure n°11 et le tableau X, les résultats obtenus par les deux méthodes employées pour évaluer l'activité antivirale des substances retenues sur la réplication *in vitro* de RVFV sont similaires. Dans les deux cas, la décroissance du titre infectieux ou du titre génomique est dose-dépendante pour 3 des composés : la ribavirine, l'IFN α et la 6-azauridine. Pour la glycyrrhizine, on observe un effet-seuil, avec absence d'effet antiviral pour les concentrations les plus faibles et une brusque inhibition de la réplication pour les concentrations les plus élevées.

L'utilisation du test de corrélation des rangs de Spearman a montré que ces résultats étaient étroitement corrélés ($p < 0,01$).

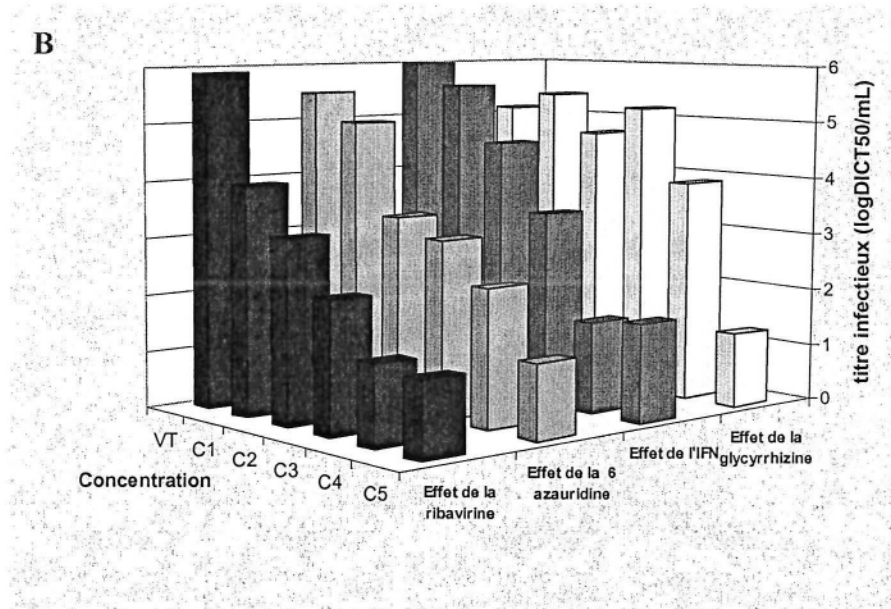
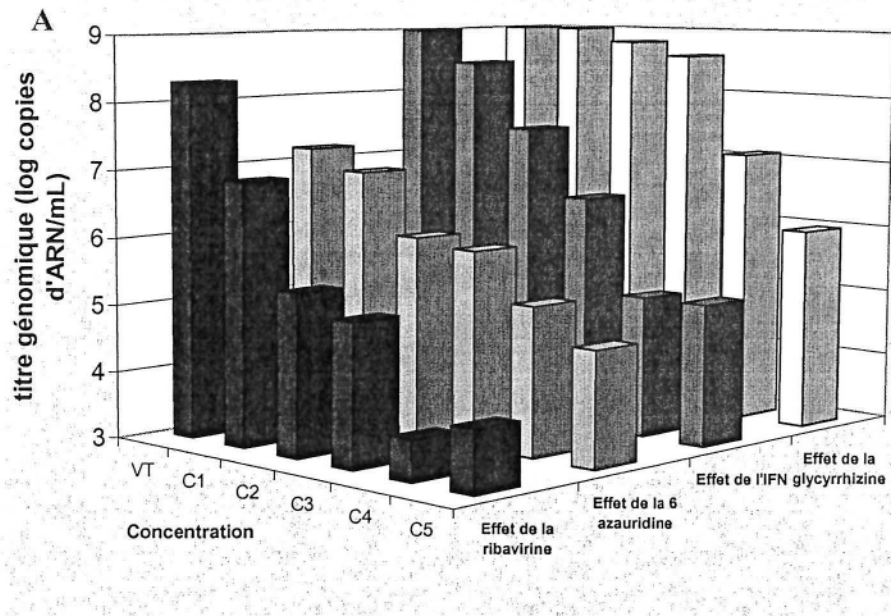


Figure n°11. Effet de concentrations croissantes de différentes substances antivirales sur la réplication du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* exprimé soit par la méthode du titre génomique (A), soit par la méthode du titre infectieux (B). Les concentrations sont croissantes de C1 à C5. VT représente le virus non traité.

Composé Testé	Concentration Finale ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou UI.mL^{-1})	Réduction du titre infectieux ($\log \text{TCID}_{50}.\text{mL}^{-1}$)	Réduction du titre génomique ($\log \text{RNA copies.mL}^{-1}$)
Glycyrrhizine	156,25	Nr ^a	Nr
	312,5	Nr	Nr
	625	Nr	Nr
	1250	1,2	2
	2500	>4,1	3
IFNα	1	0,5	0,5
	10	1,5	1,5
	100	2,7	2,5
	1000	4,5	3,9
	10000	4,4	3,9
Ribavirine	62,5	1,9	1,4
	125	2,7	>2,9
	250	3,6	>3,2
	500	>4,6	>4,7
	1000	>4,6	>4,4
6-azauridine	0,3125	0,5	0,6
	0,625	2,1	1,5
	1,25	2,4	1,7
	2,5	3,1	2,2
	5	>4,5	2,6

Tableau X. Effet de différentes concentrations de glycyrrhizine, IFN α , ribavirine et 6-azauridine sur la quantité de virus de la fièvre de la Vallée du Rift détectée dans des cellules Vero exprimée soit en $\log \text{DICT}_{50}.\text{mL}^{-1}$ (VTR) soit en $\log \text{copies d'ARN.mL}^{-1}$ (GTR).

^a Nr= non réduit

3.7. Evaluation du potentiel d'utilisation diagnostique de la RT-PCR en temps réel

3.7.1. Sérums animaux

Le tableau XI montre la comparaison entre les titres infectieux en culture de cellules et la quantification en temps réel. L'évolution en fonction du temps est similaire et on constate qu'il n'y a pas d'inhibition majeure ou d'amplification non spécifique quand on travaille sur des sérum de souris.

La souche clone 13, qui n'est pas détectée, est la souche déléetée dans la zone codant pour NSs et qui est ciblée par les amorces et la sonde. Cette souche est avirulente et présente surtout un intérêt vaccinal pour remplacer la souche MP12. Elle risque donc peu d'être rencontrée en pathologie humaine.

Echantillon (souche et temps post- infection)	Titre infectieux (log PFU.mL ⁻¹)	Quantification (log ARN copies.mL ⁻¹)
ZH548 24h	4,6	6,8
ZH548 33h	5,9	8,6
ZH548 48h	>8,5	10
Clone 13 7h	<2	Non détecté
Clone 13 33h	8,2	Non détecté
Souris non infectées	Non détectée	Non détecté

Tableau XI. Quantification en temps réel du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* extrait de sérums de souris infectées. Les titres infectieux ont été préalablement déterminés et sont exprimés en log PFU.mL⁻¹.

3.7.2. Sérums humains

Le tableau XII montre la comparaison entre le titre infectieux initial de sérums humains enrichis et la quantification correspondante. Là aussi, l'évolution est similaire et il n'y a ni forte inhibition ni amplification non spécifique. Il est à noter que la souche MP12, par rapport à clone 13, n'a subi que 4 substitutions de bases et aucune délétion dans le brin S. La protéine NSs n'est modifiée que d'un seul acide aminé par rapport à la souche ZH 548 [106].

Titre infectieux (log DICT ₅₀ .mL ⁻¹)	Cycle de sortie sur Light Cycler® (C _T)	Quantification (log ARN copies.mL ⁻¹)
3	30,8	7,2
4	28,8	7,7
4	28,5	7,8
4	27,9	7,9
4	27,6	8,0
4	27,7	8,0
5	23,4	9,1
Sérum non infecté	Non détecté	Non détecté

Tableau XII. Quantification en temps réel de différents sérums humains expérimentalement infectés avec trois différentes concentrations du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* (souche MP12).

4. Discussion et conclusion

Sur 9 composés antiviraux évalués sur le *virus de la fièvre de la Vallée du Rift*, 4 ont été sélectionnés pour leur effet inhibiteur sur la réplication virale et pour leur possibilité d'utilisation chez l'homme. La ribavirine, la 6-azauridine et l'IFN α se sont montrés très actifs à faible concentration et ont donné une réduction de titre infectieux dose-dépendante alors que la glycyrrhizine n'a montré aucune efficacité à faible concentration mais est active aux plus fortes concentrations testées. Parmi ces substances, seuls la ribavirine et l'IFN α avaient déjà été étudiés sur la réplication de RVFV [54, 70, 93]. La ribavirine en injection intraveineuse s'est déjà révélée efficace pour traiter d'autres fièvres hémorragiques, y compris la fièvre de Lassa, les fièvres hémorragiques avec syndrome rénal et la fièvre hémorragique de Crimée-Congo. De plus, le ministère de la santé d'Arabie Saoudite a récemment évalué la faisabilité d'un essai randomisé en double-aveugle de son utilisation en injection intraveineuse contre les infections à RVFV [119].

La 6-azauridine et la glycyrrhizine se sont montrées efficaces contre un autre virus du genre *Phlebovirus*, le virus de la fièvre à phlébotome (SFSV). Maintenant, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité d'une bi-thérapie (e.g. 6-azauridine et ribavirine ou ribavirine et IFN α) comme cela a été fait pour le SFSV [15].

La première étape lors du criblage de molécules potentiellement antivirales est l'évaluation de la capacité à inhiber la réplication virale *in vitro*. La méthode de référence de réduction du titre infectieux, qui est actuellement utilisée, nécessite une semaine pour la détermination du titre infectieux en culture de cellules [15, 54, 90, 93]. La méthode de réduction des titres génomiques pourrait être utilisée comme alternative en réduisant la durée des manipulations à environ 4 h. De plus elle éviterait l'amplification de matériel infectieux qui augmente le risque de contamination croisée et surtout le risque d'infection des personnels

de laboratoire, permettant ainsi de travailler avec des pathogènes inactivés de classe 3 ou 4 dans un équipement de classe 2.

Nous avons observé un écart variant de 3 à 4 log entre les valeurs exprimées en $DICT_{50}.mL^{-1}$ et celles exprimées en copies d'ARN. mL^{-1} après RT-PCR en temps réel. Houg a évalué dans un travail récent que chaque PFU pour le virus de la dengue (*Flavivirus*) devait représenter au moins 100 équivalents génomiques [31]. De la même manière, Garin et *al* ont trouvé une différence de 3 log avec le virus Puumala [27]. Cet écart est due d'une part à la présence d'ARN de particules virales non infectieuses et dépend d'autre part du niveau d'expression du segment S dans les particules virales. Le brin S code notamment pour la protéine non structurale NSs dont on sait qu'elle joue un rôle important dans la pathogénicité virale [10, 61, 105, 111]. Ce segment est donc peut-être surexprimé dans les virions infectieux.

La biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) est de plus en plus utilisée pour détecter et identifier des virus ou pour des études phylogénétiques [28, 32, 42, 78, 79, 81, 82, 85, 87, 88, 101, 102]. La détection en temps réel représente une avancée significative dans la PCR et la détection des produits amplifiés par rapport à un système ouvert qui peut être contaminé lors des transferts des produits amplifiés pour analyse (dépôt sur gel, hybridation). En effet, cette nouvelle technique utilise un système fermé où la formation des produits de PCR est mesurée en temps réel sans manipulation secondaire.

La PCR en temps réel permet également le suivi clinique d'une charge virale comme il a été décrit pour les infections à HCV, HBV, HSV-1, CMV ou HHV-8 [2, 39, 43, 49, 97]. Comparée aux autres méthodes de quantification, la PCR en temps réel se révèle souvent être plus sensible [49, 68]. Elle s'est aussi montrée plus efficace dans le suivi de la charge virale chez des patients traités par l'IFN pour une infection à HCV [97]. Cette technique peut également être appliquée à l'identification immédiate de l'agent étiologique soit pour la prise

en charge d'un patient en phase aiguë d'une pathologie grave ou lors d'investigations au tout début d'une épidémie d'origine inconnue.

Actuellement, à part les signes cliniques et biologiques, le diagnostic d'une infection à RVFV est basé sur l'isolement du virus sur cellules de mammifères ou de moustiques ou par injection intracérébrale à des souriceaux nouveau-nés et détection antigéniques [20, 40, 50, 55]. Récemment, Sall et *al* ont décrit une méthode de RT-PCR et PCR nichée qui permet la détection du virus dans des prélèvements cliniques ayant déjà été confirmés par isolement [81]. Cependant, la détection par biologie moléculaire n'est pas encore utilisée comme outil de diagnostic courant.

Ce travail décrit l'utilisation d'une RT-PCR en temps réel pour l'identification et la quantification de l'ARN viral du RVFV. La sensibilité de la méthode a été évaluée sur ARN synthétique et viral. La spécificité vis à vis de différentes souches de RVFV a été vérifiée avec d'autres virus du genre *Phlebovirus* (Belteria, Toscana and Icoaraci). Il est important de noter que la sensibilité de la méthode dépend de nombreux facteurs, par exemple l'origine du prélèvement analysé, la technique d'extraction employée et les conditions de RT-PCR. Par exemple, pour les échantillons cellulaires, nous avons d'abord utilisé une extraction sur colonne de silice (QIAamp® Viral RNA kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) mais nous avons dû ensuite utiliser une extraction phénol/chloroforme pour surmonter un problème d'inhibition de l'étape de RT-PCR. Nous avons également augmenté la sensibilité de la RT en ajoutant du glycogène aux échantillons. Enfin, nous avons évalué le potentiel d'utilisation diagnostique de cette technique, chez l'animal ou chez l'homme. La méthode a permis la détection du virus dans des sérums de souris infectées par la souche ZH548 et dans des sérums humains expérimentalement infectés avec la souche MP12, alors que les sérums non infectés témoins n'ont jamais donné lieu à une amplification non spécifique. Il faut maintenant l'utiliser sur le terrain pour confirmer son utilisation clinique.

En conclusion, la détection et quantification par RT-PCR en temps réel du *virus de la fièvre de la Vallée du Rift* offrent un nouveau moyen d'évaluer l'efficacité *in vitro* de substances antivirales. Cette méthode est également un outil prometteur pour le diagnostic, le suivi thérapeutique et la mesure de la charge virale.

Ce travail a donné lieu à un article publié dans le *Journal of Clinical Microbiology*, joint en annexe.

5. Références bibliographiques

1. **Abdel-Wahab K.S., L.M. El Baz, E.M. El-Tayeb, H. Omar, M.A. Ossman and W. Yasin** 1978, Rift Valley Fever virus infections in Egypt: Pathological and virological findings in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **72**: 392-6.
2. **Abe A., K. Inoue, T. Tanaka, J. Kato, N. Kajiyama, R. Kawaguchi, S. Tanaka, M. Yoshiba and M. Kohara** 1999, Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol.* **37**: 2899-903.
3. **Accardi L., C. Prehaud, P. Di Bonito, S. Mochi, M. Bouloy and C. Giorgi** 2001, Activity of Toscana and Rift Valley fever virus transcription complexes on heterologous templates. *J Gen Virol.* **82**: 781-5.
4. **Adam F., A. Jouan, O. Riou, B. Philippe, I. Coulibaly, B. Berlioz, J. Meegan, B. Leguenno and J.P. Digoutte** 1989, [Development of a clinical and biological scoring system for the prognosis of Rift Valley fever]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* **82**: 628-36.
5. **Ahmad K.** 2000, More deaths from Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen. *Lancet.* **356**: 1422.
6. **Arthur R.R., M.S. el-Sharkawy, S.E. Cope, B.A. Botros, S. Oun, J.C. Morrill, R.E. Shope, R.G. Hibbs, M.A. Darwish and I.Z. Imam** 1993, Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *Lancet.* **342**: 1149-50.
7. **Barnard B.J.** 1979, Rift Valley fever vaccine--antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine. *J S Afr Vet Assoc.* **50**: 155-57.
8. **Barnard B.J. and M.J. Botha** 1977, An inactivated rift valley fever vaccine. *J S Afr Vet Assoc.* **48**: 45-8.
9. **Boiro I., O.K. Konstaninov and A.D. Numerov** 1987, [Isolation of Rift Valley fever virus from bats in the Republic of Guinea]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* **80**: 62-7.

10. **Bouloy M., C. Janzen, P. Vialat, H. Khun, J. Pavlovic, M. Huerre and O. Haller** 2001, Genetic Evidence for an Interferon-Antagonistic Function of Rift Valley Fever Virus Nonstructural Protein NSs. *J Virol.* **75**: 1371-77.
11. **Canonico P.G., M. Kende, B.J. Luscri and J.W. Huggins** 1984, In vivo activity of antivirals against exotic RNA viral infections. *J Antimicrob Chemother.* **14 Suppl A**: 27-41.
12. **Caplen H., C.J. Peters and D.H. Bishop** 1985, Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J Gen Virol.* **66**: 2271-77.
13. **Clerc Y., F. Rodhain, J.P. Digoutte, R. Albignac and P. Coulanges** 1982, [Arbovirus exploratory program at the Pasteur Institute of Madagascar: results 1976-1980]. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* **49**: 65-78.
14. **Collett M.S., A.F. Purchio, K. Keegan, S. Frazier, W. Hays, D.K. Anderson, M.D. Parker, C. Schmaljohn, J. Schmidt and J.M. Dalrymple** 1985, Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley fever virus. *Virology.* **144**: 228-45.
15. **Crance J.M., D. Gratier, J. Guimet and A. Jouan** 1997, Inhibition of sandfly fever Sicilian virus (*Phlebovirus*) replication in vitro by antiviral compounds. *Res Virol.* **148**: 353-65.
16. **Davies F.G., E. Kilelu, K.J. Linthicum and R.G. Pegram** 1992, Patterns of Rift Valley fever activity in Zambia. *Epidemiol Infect.* **108**: 185-91.
17. **Daubney R and J. Hudson** 1931, Enzootic hepatitis or Rift Valley fever : an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J. Pathol.* **34**: 545-57
18. **Digoutte J.P.** 1999, [Present status of an arbovirus infection: yellow fever, its natural history of hemorrhagic fever, Rift Valley fever]. *Bull Soc Pathol Exot.* **92**: 343-48.
19. **Digoutte J.P. and C.J. Peters** 1989, General aspects of the 1987 Rift Valley fever epidemic in Mauritania. *Res Virol.* **140**: 27-30.

20. Digoutte J.P., A. Jouan, B. Le Guenno, O. Riou, B. Philippe, J. Meegan, T.G. Ksiazek and C.J. Peters 1989, Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudoscutellaris* cells: comparison with other diagnostic methods. *Res Virol.* **140**: 31-41.
21. Ellis D.S., P.V. Shirodaria, E. Fleming and D.I. Simpson 1988, Morphology and development of Rift Valley fever virus in Vero cell cultures. *J Med Virol.* **24**: 161-74.
22. Eun A.J., M. Seoh and S. Wong 2000, Simultaneous quantitation of two orchid viruses by the TaqMan real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* **87**: 151-60.
23. Fontenille D., M. Traore-Lamizana, J. Trouillet, A. Leclerc, M. Mondo, Y. Ba, J.P. Digoutte and H.G. Zeller 1994, First isolations of arboviruses from phlebotomine sandflies in West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* **50**: 570-74.
24. Fontenille D., M. Traore-Lamizana, M. Diallo, J. Thonnon, J.P. Digoutte and H.G. Zeller 1998, New vectors of Rift Valley fever in West Africa. *Emerg Infect Dis.* **4**: 289-93.
25. Francis T. and T.P. Magill 1935, Rift Valley fever : a report of three cases of laboratory infection and the experimental transmission of the disease to ferrets. *J Exper Med*: 433-68.
26. Frese M., G. Kochs, H. Feldmann, C. Hertkorn and O. Haller 1996, Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol.* **70**: 915-23.
27. Gabrielsen B., T.P. Monath, J.W. Huggins, D.F. Kefauver, G.R. Pettit, G. Groszek, M. Hollingshead, J.J. Kirsi, W.M. Shannon, E.M. Schubert and et al. 1992, Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. *J Nat Prod.* **55**: 1569-81.
28. Garin D., P. C., J.M. Crance, L.F. A., A. Jouan and M. Bouloy 2001, Highly sensitive Taqman PCR detection of Puumala hantavirus. *Microbes Infect.* **3**: 739-45.

29. **Giorgi C., L. Accardi, L. Nicoletti, M.C. Gro, K. Takehara, C. Hilditch, S. Morikawa and D.H. Bishop** 1991, Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*. **180**: 738-53.

30. **Gui X.E., M. Ho, M.S. Cohen, Q.L. Wang, H.P. Huang and Q.X. Xie** 1987, Hemorrhagic fever with renal syndrome: treatment with recombinant alpha interferon. *J Infect Dis*. **155**: 1047-51.

31. **Houng H.H., D. Hritz and N. Kanesa-thasan** 2000, Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J Virol Methods*. **86**: 1-11.

32. **Ibrahim M.S., M.J. Turell, F.K. Knauert and R.S. Lofts** 1997, Detection of Rift Valley fever virus in mosquitoes by RT-PCR. *Mol Cell Probes*. **11**: 49-53.

33. **Jin H. and R.M. Elliott** 1993, Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol*. **67**: 1396-404.

34. **Jouan A., B. Le Guenno and J.P. Digoutte** 1988, An RVF epidemic in Southern Mauritania. *Ann Inst Pasteur Virol*. **3**: 307-8.

35. **Kakach L.T., J.A. Suzich and M.S. Collett** 1989, Rift Valley fever virus M segment: phlebovirus expression strategy and protein glycosylation. *Virology*. **170**: 505-10.

36. **Kakach L.T., T.L. Wasmoen and M.S. Collett** 1988, Rift Valley fever virus M segment: use of recombinant vaccinia viruses to study Phlebovirus gene expression. *J Virol*. **62**: 826-33.

37. **Kende M., C.R. Alving, W.L. Rill, G.M. Swartz and P.G. Canonico** 1985, Enhanced efficacy of liposome-encapsulated ribavirin against Rift Valley fever virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. **27**: 903-7.

38. **Kende M., H.W. Lupton, W.L. Rill, H.B. Levy and P.G. Canonico** 1987, Enhanced therapeutic efficacy of poly(ICLC) and ribavirin combinations against Rift Valley fever virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **31**: 986-90.
39. **Kessler H.H., G. Muhlbauer, B. Rinner, E. Stelzl, A. Berger, H.W. Dorr, B. Santner, E. Marth and H. Rabenau** 2000, Detection of Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* **38**: 2638-642.
40. **Knauert F.K., J.M. Meegan, A. Jouan, T.G. Ksiazek, B. Le Guenno, J.L. Sarthou, C.J. Peters and J.P. Digoutte** 1989, Assessment of an rDNA probe filter hybridization assay for the detection of Rift Valley fever virus RNA in human serum samples from the Mauritanian epidemic. *Res Virol.* **140**: 47-57.
41. **Kohl A., V. di Bartolo and M. Bouloy** 1999, The Rift Valley fever virus nonstructural protein NSs is phosphorylated at serine residues located in casein kinase II consensus motifs in the carboxy-terminus. *Virology.* **263**: 517-25.
42. **Kuno G.** 1998, Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods.* **72**: 27-41.
43. **Lallemand F., N. Desire, W. Rozenbaum, J.C. Nicolas and V. Marechal** 2000, Quantitative analysis of human herpesvirus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* **38**: 1404-408.
44. **Laughlin L.W., J.M. Meegan, L.J. Strausbaugh, D.M. Morens and R.H. Watten** 1979, Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **73**: 630-33.
45. **Linthicum K.J., A. Anyamba, C.J. Tucker, P.W. Kelley, M.F. Myers and C.J. Peters** 1999, Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science.* **285**: 397-400.

46. **Linthicum K.J., F.G. Davies, A. Kairo and C.L. Bailey** 1985, Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg (Lond)*. **95**: 197-209.
47. **London S.D., A.L. Schmaljohn, J.M. Dalrymple and C.M. Rice** 1992, Infectious enveloped RNA virus antigenic chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 207-11.
48. **Lopez N., R. Muller, C. Prehaud and M. Bouloy** 1995, The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol*. **69**: 3972-979.
49. **Machida U., M. Kami, T. Fukui, Y. Kazuyama, M. Kinoshita, Y. Tanaka, Y. Kanda, S. Ogawa, H. Honda, S. Chiba, K. Mitani, Y. Muto, K. Osumi, S. Kimura and H. Hirai** 2000, Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol*. **38**: 2536-542.
50. **Meegan J., B. Le Guenno, T. Ksiazek, A. Jouan, F. Knauert, J.P. Digoutte and C.J. Peters** 1989, Rapid diagnosis of Rift Valley fever: a comparison of methods for the direct detection of viral antigen in human sera. *Res Virol*. **140**: 59-65.
51. **Meegan J.M., J.P. Digoutte, C.J. Peters and R.E. Shope** 1983, Monoclonal antibodies to identify Zinga virus as Rift Valley Fever virus. *Lancet*. **1**: 641.
52. **Morrill J.C., C.A. Mebus and C.J. Peters** 1997, Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle. *Am J Vet Res*. **58**: 1104-109.
53. **Morrill J.C., C.A. Mebus and C.J. Peters** 1997, Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovids. *Am J Vet Res*. **58**: 1110-114.
54. **Morrill J.C., C.W. Czarniecki and C.J. Peters** 1991, Recombinant human interferon-gamma modulates Rift Valley fever virus infection in the rhesus monkey. *J Interferon Res*. **11**: 297-304.

55. Morrill J.C., F.K. Knauert, T.G. Ksiazek, J.M. Meegan and C.J. Peters 1989, Rift Valley fever infection of rhesus monkeys: implications for rapid diagnosis of human disease. *Res Virol.* **140**: 139-46.

56. Morrill J.C., G.B. Jennings, T.M. Cosgriff, P.H. Gibbs and C.J. Peters 1989, Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferon-alpha. *Rev Infect Dis.* **11** Suppl 4: S815-25.

57. Morrill J.C., L. Carpenter, D. Taylor, H.H. Ramsburg, J. Quance and C.J. Peters 1991, Further evaluation of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in sheep. *Vaccine.* **9**: 35-41.

58. Morvan J., J.F. Saluzzo, D. Fontenille, P.E. Rollin and P. Coulanges 1991, Rift Valley fever on the east coast of Madagascar. *Res Virol.* **142**: 475-82.

59. Morvan J., P.E. Rollin, S. Laventure, I. Rakotoarivony and J. Roux 1992, Rift Valley fever epizootic in the central highlands of Madagascar. *Res Virol.* **143**: 407-15.

60. Muller R., C. Argentini, M. Bouloy, C. Prehaud and D.H. Bishop 1991, Completion of the genome sequence of Rift Valley fever phlebovirus indicates that the L RNA is negative sense and codes for a putative transcriptase-replicase [corrected]. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5433.

61. Muller R., J.F. Saluzzo, N. Lopez, T. Dreier, M. Turell, J. Smith and M. Bouloy 1995, Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am J Trop Med Hyg.* **53**: 405-11.

62. Muller R., O. Poch, M. Delarue, D.H. Bishop and M. Bouloy 1994, Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *J Gen Virol.* **75**: 1345-352.

63. Niklasson B. 1982, Rift Valley fever virus vaccine trial: study of side-effects in humans. *Scand J Infect Dis.* **14**: 105-9.

64. **Niklasson B., J.M. Meegan and E. Bengtsson** 1979, Antibodies to Rift Valley fever virus in Swedish U.N. soldiers in Egypt and the Sinai. *Scand J Infect Dis.* **11**: 313-14.
65. **Niklasson B., G.F. Meadors and C.J. Peters** 1984, Active and passive immunization against Rift Valley fever virus infection in Syrian hamsters. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]*. **92**: 197-200.
66. **Olaleye O.D., O. Tomori and H. Schmitz** 1996, Rift Valley fever in Nigeria : infections in domestic animals. *Rev Sci Tech.* **15**: 937-46.
67. **Olaleye O.D., O. Tomori, M.A. Ladipo and H. Schmitz** 1996, Rift Valley fever in Nigeria: infections in humans. *Rev Sci Tech.* **15**: 923-35.
68. **Pas S.D., E. Fries, R.A. De Man, A.D. Osterhaus and H.G. Niesters** 2000, Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol.* **38**: 2897-901.
69. **Peters C.J.** 1997, Emergence of Rift Valley fever. In *JF Saluzzo, B Dodet (eds), Factors in the emergence of Arbovirus diseases, Elsevier, Paris*: 253-264.
70. **Peters C.J., J.A. Reynolds, T.W. Slone, D.E. Jones and E.L. Stephen** 1986, Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator. *Antiviral Res.* **6**: 285-97.
71. **Philippe B., A. Jouan, O. Riou and I. Coulibaly** 1990, Rift Valley fever, control and management of an epidemic. *Med Arm.* **18**: 527-30.
72. **Pittman P.R., C.T. Liu, T.L. Cannon, R.S. Makuch, J.A. Mangiafico, P.H. Gibbs and C.J. Peters** 1999, Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. *Vaccine.* **18**: 181-9.
73. **Prehaud C. and M. Bouloy** 1997, Rift Valley fever-. *Ann Inst Pasteur Virol.* **8**: 233-44.

74. Prehaud C., N. Lopez, M.J. Blok, V. Obry and M. Bouloy 1997, Analysis of the 3' terminal sequence recognized by the Rift Valley fever virus transcription complex in its ambisense S segment. *Virology*. **227**: 189-97.

75. Pretorius A., M.J. Oelofsen, M.S. Smith and E. van der Ryst 1997, Rift Valley fever virus: a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa. *Am J Trop Med Hyg*. **57**: 693-98.

76. Randall R., L. Binn and V.R. Harrison 1964, Immunization against Rift Valley fever virus. Studies on the immunogenicity of lyophilized formalin-inactivated vaccine. *J Immunol*. **93**: 293-99.

77. Reed L.J. and H. Muench 1938, A simple method of estimating fifty per cent end points. *Amer J Hyg*: 493-97.

78. Rodriguez L.L., G.O. Maupin, T.G. Ksiazek, P.E. Rollin, A.S. Khan, T.F. Schwarz, R.S. Lofts, J.F. Smith, A.M. Noor, C.J. Peters and S.T. Nichol 1997, Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg*. **57**: 512-18.

79. Sall A.A., P.M. de Zanolto, H.G. Zeller, J.P. Digoutte, Y. Thiongane and M. Bouloy 1997, Variability of the NS(S) protein among Rift Valley fever virus isolates. *J Gen Virol*. **78**: 2853-858.

80. Sall A.A., P.M. de Zanolto, P. Vialat, O.K. Sene and M. Bouloy 1998, Origin of 1997-98 Rift Valley fever outbreak in East Africa. *Lancet*. **352**: 1596-597.

81. Sall A.A., J. Thonnon, O.K. Sene, A. Fall, M. Ndiaye, B. Baudez, C. Mathiot and M. Bouloy 2001, Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol. Methods* **91**: 85-92.

82. Sall A.A., P.M. de Zanutto, O.K. Sene, H.G. Zeller, J.P. Digoutte, Y. Thiongane and M. Bouloy 1999, Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *J Virol.* **73**: 8196-200.

83. Sall A.A., P.M. de Zanutto, P. Vialat, O.K. Sene and M. Bouloy 1998, Molecular epidemiology and emergence of Rift Valley fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **93**: 609-14.

84. Saluzzo J.F., J.P. Digoutte, M. Cornet, D. Baudon, J. Roux and V. Robert 1984, Isolation of Crimean-Congo haemorrhagic fever and Rift Valley fever viruses in Upper Volta. *Lancet.* **1**: 1179.

85. Scaramozzino N., J.M. Crance, A. Jouan, D.A. DeBriel, F. Stoll and D. Garin 2001, Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-pcr assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the ns5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* **39**: 1922-927.

86. Schmaljohn C.S. 1996, *Bunyaviridae: the viruses and their replication.* In: *Fields virology* (Fields B. N. et al, eds). Lippincott-Raven, Philadelphia.

87. Schwarz T.F., G. Jager, S. Gilch and H. Nitschko 1995, Nested RT-PCR for detection of sandfly fever virus, serotype Toscana, in clinical specimens, with confirmation by nucleotide sequence analysis. *Res Virol.* **146**: 355-62.

88. Schwarz T.F., H. Nsanze, M. Longson, H. Nitschko, S. Gilch, H. Shurie, A. Ameen, A.R. Zahir, U.G. Acharya and G. Jager 1996, Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg.* **55**: 190-96.

89. Schwentker F.F. and I.M. Rivers 1934, *J. exper. Med.*: 305.

90. Sidwell R.W., J.H. Huffman, B.B. Barnett and D.Y. Pifat 1988, In vitro and in vivo *Phlebovirus* inhibition by ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* **32**: 331-36.

91. **Smithburn K.C.** 1949, Rift Valley fever: the neurotropic adaptation of virus and experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br J Exp Pathol.* **30**: 1-6.
92. **Smithburn K.C., A.J. Haddas and J.D. Gillet** 1948, Rift Valley fever isolation of the virus from wild mosquitoes. *Brit. J. expert. Path.*: 107-21.
93. **Stephen E., D. Jones, C.J. Peters, G.A. Eddy, L.P. S. and P.B. Jahrling** 1980, Ribavirin treatment of toga-, arena- and bunyavirus infections in subhuman primates and other laboratory animal species. in *R. A. Smith and Kirkpatrick (ed.), Ribavirin: a broad spectrum antiviral agent. Academic Press, Inc., New York.*: 169-83.
94. **Suzich J.A., L.T. Kakach and M.S. Collett** 1990, Expression strategy of a phlebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever virus M segment. *J Virol.* **64**: 1549-555.
95. **Swanepoel R., B. Manning and J.A. Watt** 1979, Fatal Rift Valley fever of man in Rhodesia. *Cent Afr J Med.* **25**: 1-8.
96. **Takehara K., M.K. Min, J.K. Battles, K. Sugiyama, V.C. Emery, J.M. Dalrymple and D.H. Bishop** 1989, Identification of mutations in the M RNA of a candidate vaccine strain of Rift Valley fever virus. *Virology.* **169**: 452-57.
97. **Takeuchi T., A. Katsume, T. Tanaka, A. Abe, K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, R. Kawaguchi, S. Tanaka and M. Kohara** 1999, Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology.* **116**: 636-42.
98. **Turell M.J. and P.V. Perkins** 1990, Transmission of Rift Valley fever virus by the sand fly, *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* **42**: 185-88.
99. **Turell M.J., J.F. Saluzzo, R.F. Tammariello and J.F. Smith** 1990, Generation and transmission of Rift Valley fever viral reassortants by the mosquito *Culex pipiens*. *J Gen Virol.* **71**: 2307-312.

100. Turell M.J., P.A. Rossignol, A. Spielman, C.A. Rossi and C.L. Bailey 1984, Enhanced arboviral transmission by mosquitoes that concurrently ingested microfilariae. *Science*. **225**: 1039-341.

101. Valassina M., A.M. Cuppone, S. Bianchi, L. Santini and M.G. Cusi 1998, Evidence of Toscana virus variants circulating in Tuscany, Italy, during the summers of 1995 to 1997. *J Clin Microbiol*. **36**: 2103-104.

102. Valassina M., M.G. Cusi and P.E. Valensin 1996, Rapid identification of Toscana virus by nested PCR during an outbreak in the Siena area of Italy. *J Clin Microbiol*. **34**: 2500-502.

103. van Velden D.J., J.D. Meyer, J. Olivier, J.H. Gear and B. McIntosh 1977, Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinicopathological study. *S Afr Med J*. **51**: 867-71.

104. Vaughan J.A. and M.J. Turell 1996, Facilitation of Rift Valley fever virus transmission by Plasmodium berghei sporozoites in Anopheles stephensi mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. **55**: 407-9.

105. Vialat P., A. Billecocq, A. Kohl and M. Bouloy 2000, The S segment of rift valley fever phlebovirus (Bunyaviridae) carries determinants for attenuation and virulence in mice. *J Virol*. **74**: 1538-543.

106. Vialat P., R. Muller, T.H. Vu, C. Prehaud and M. Bouloy 1997, Mapping of the mutations present in the genome of the Rift Valley fever virus attenuated MP12 strain and their putative role in attenuation. *Virus Res*. **52**: 43-50.

107. Walsh J. 1988, Rift Valley fever rears its head. *Science*. **240**: 1397-399.

108. Westover J.D., G.R. Revankar, R.K. Robins, R.D. Madsen, J.R. Ogden, J.A. North, R.W. Mancuso, R.J. Rousseau and E.L. Stephen 1981, Synthesis and antiviral activity of certain 9-beta-D-ribofuranosylpurine-6-carboxamides. *J Med Chem*. **24**: 941-46.

109. **Wilson M.L.** 1994, Ecology and the epidemiology of disease emergence. *Ann N Y Acad Sci.* **740**: 169-80.

110. **Wood S.G., K.G. Upadhyya, N.K. Dalley, P.A. McKernan, P.G. Canonico, R.K. Robins and G.R. Revankar** 1985, Synthesis and biological activity of 5-thiobredinin and certain related 5-substituted imidazole-4-carboxamide ribonucleosides. *J Med Chem.* **28**: 1198-203.

111. **Yadani F.Z., A. Kohl, C. Prehaud, A. Billecocq and M. Bouloy** 1999, The carboxy-terminal acidic domain of Rift Valley Fever virus NSs protein is essential for the formation of filamentous structures but not for the nuclear localization of the protein. *J Virol.* **73**: 5018-25.

112. **Zeller H.G., D. Fontenille, M. Traore-Lamizana, Y. Thiongane and J.P. Digoutte** 1997, Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* **56**: 265-72.

113. **Zeller H.G., R. Bessin, Y. Thiongane, I. Bapetel, K. Teou, M.G. Ala, A.N. Atse, R. Sylla, J.P. Digoutte and J.A. Akakpo** 1995, Rift Valley fever antibody prevalence in domestic ungulates in Cameroon and several west African countries (1989-1992) following the 1987 Mauritanian outbreak. *Res Virol.* **146**: 81-5.

114. **Zvilich M., J.C. Williams, D. Waag, W.R. Rill, P. Bell and M. Kende** 1995, Efficacy of *Coxiella burnetii* and its chloroform-methanol residue (CMR) fraction against Rift Valley fever virus infection in mice. *Antiviral Res.* **27**: 137-49.

115. **Zvilich M., J.C. Williams, D. Waag, W.R. Rill, R.J. Malli, P. Bell and M. Kende** 1995, Characterization of the non-specific humoral and cellular antiviral immunity stimulated by the chloroform-methanol residue (CMR) fraction of *Coxiella burnetii*. *Antiviral Res.* **27**: 389-404.

116. **anonymous** 1994, Rift Valley fever. *Wkly Epidemiol Rec.* **69**: 74-6.

117. **anonymous** 1994, Rift Valley fever--Egypt, 1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **43**: 693, 699-700.

118. **anonymous** 1998, Rift Valley Fever--East Africa, 1997-1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **47**: 261-64.

119. **anonymous** 2000, Outbreak of Rift Valley fever--Saudi Arabia, August-October, 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **49**: 905-8.

120. **anonymous** 2000, Update: outbreak of Rift Valley Fever--Saudi Arabia, August-November 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **49**: 982-85.

Annexe:

Article publié dans le Journal of Clinical Microbiology

Quantitative Real-Time PCR Detection of Rift Valley Fever Virus and Its Application to Evaluation of Antiviral Compounds

STEPHAN GARCIA,¹ JEAN MARC CRANCE,¹ AGNES BILLECOCQ,² ANDRE PEINNEQUIN,¹
ALAIN JOUAN,¹ MICHELE BOULOY,² AND DANIEL GARIN^{1*}

Unité de Virologie, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées (CRSSA) Emile Pardé, Grenoble,¹
and Groupe des Bunyaviridés, Institut Pasteur, Paris,² France

Received 6 August 2001/Returned for modification 12 September 2001/Accepted 27 September 2001

The Rift Valley fever virus (RVFV), a member of the genus *Phlebovirus* (family *Bunyaviridae*) is an enveloped negative-strand RNA virus with a tripartite genome. Until 2000, RVFV circulation was limited to the African continent, but the recent deadly outbreak in the Arabian Peninsula dramatically illustrated the need for rapid diagnostic methods, effective treatments, and prophylaxis. A method for quantifying the small RNA segment by a real-time detection reverse transcription (RT)-PCR using TaqMan technology and targeting the nonstructural protein-coding region was developed, and primers and a probe were designed. After optimization of the amplification reaction and establishment of a calibration curve with synthetic RNA transcribed in vitro from a plasmid containing the gene of interest, real-time RT-PCR was assessed with samples consisting of RVFV from infected Vero cells. The method was found to be specific for RVFV, and it was successfully applied to the detection of the RVFV genome in animal sera infected with RVFV as well as to the assessment of the efficiency of various drugs (ribavirin, alpha interferon, 6-azauridine, and glycyrrhizin) for antiviral activity. Altogether, the results indicated a strong correlation between the infectious virus titer and the amounts of viral genome assayed by real time RT-PCR. This novel method could be of great interest for the rapid diagnosis and screening of new antiviral compounds as it is sensitive and time saving and does not require manipulation of infectious material.

AQ: A The Rift Valley fever (RVF) virus (RVFV), a member of the genus *Phlebovirus*, belongs to the *Bunyaviridae* family and possesses a negative-stranded, tripartite RNA genome composed of a large, a medium, and a small (S) segment (for reviews, see references 9 and 37). Like other phleboviruses, the S segment utilizes an ambisense strategy to code for two proteins, the nucleocapsid protein and the nonstructural protein (NS_s), which are synthesized from subgenomic viral complementary and viral sense mRNA, respectively.

RVF is a mosquito-borne zoonosis predominantly provoking the death of young animals and abortion (e.g., sheep and goats) (for reviews, see references 24, 39 and 41). The disease was first identified in sheep by Daubney et al. in Kenya in 1931, and it is endemic almost everywhere in subtropical Africa (6). Transmission to humans occurs primarily by contact with infected animal body fluids and by mosquito bites. Infection is usually asymptomatic or associated with a brief self-limited febrile illness. However, complications such as retinitis, encephalitis, or hemorrhagic fever occur in some patients with mortality rates of up to 10 to 12% (21, 28).

The potential of RVF as a disease emerging in new areas was first documented in Egypt in 1977 (16), and since then, epidemics have occurred in Mauritania (1987 to 1988 and 1998), Madagascar (1990 to 1991), Egypt (1993), and eastern Africa (in Kenya, Somalia, and Tanzania) (references 33 and 34 and references therein). Recently, the outbreak on the

Arabian Peninsula (in Yemen and Saudi Arabia) represented the first case of RVF outside Africa (2, 4). Epizootics and epidemics are associated with periods of heavy rainfall and the concomitant presence of large numbers of mosquitoes (18). The survival of RVFV during interepizootics is believed to depend on transovarial transmission of the virus in floodwater *Aedes* mosquitoes (17).

Experimental vaccines are still in development, and no proven-specific therapy is available for humans (3, 29). Thus, effective antiviral agents would be useful for treating severe infections or reducing viremia in amplifying hosts, thereby limiting viral propagation by biting arthropods. Currently, diagnosis is based on detection of specific antibodies or virus isolation in animal and mosquito cells (4). Reverse transcription (RT)-PCR techniques have been described and used to detect the RVFV genome in mosquitoes (11) and, recently, in clinical samples (35). In this work we developed a real-time RT-PCR method in order to detect and specifically quantify the virus either from cells or from sera and to evaluate the potential of this assay for the diagnosis and screening of antiviral compounds.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus, and mouse sera. Cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in 199 culture medium (M199) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum. RVFV strains MP12, ZH501, ZH548, ArD38661, 74HB59, and clone 13 and the closely related phleboviruses Toscana, Icoaraci, and Belterra were grown in Vero cells (ATCC CCL-81) by serial passage. Virus titers were determined either by the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) method (30) or by counting the PFU under the agarose layer.

Mice were inoculated intraperitoneally with 10⁴ PFU of RVFV strain ZH548, and blood was collected at different times postinoculation by veinal puncture at the retro-orbital sinus.

* Corresponding author. Mailing address: Unité de Virologie, CRSSA, 24 avenue des Maquis du Grésivaudan, BP 87-38702 La Tronche cedex, France. Phone: 33-476-63-68-44. Fax: 33-476-63-69-17. E-mail: Daniel.Garin@wanadoo.fr.

RNA in vitro transcription. A 750-bp RNA fragment encompassing the complete NS_s open reading frame of the RVFV MP12 strain in the genomic sense orientation was transcribed in vitro from the pGem3-NS_s plasmid (19) by using the T7 RNA polymerase (Promega) under the conditions recommended by the supplier. The DNA template was eliminated by extensive treatment with RNase-free DNase. Proteins were eliminated by phenol-chloroform extraction, and RNA was concentrated after isopropanol precipitation. The amount of RNA was estimated by spectrophotometry, and known amounts were used to determine the standard curve for real-time RNA quantification.

RNA extraction. Vero cells were infected with the MP12 virus at a rate of 0.01 PFU per cell, and virus present in the maintenance medium was collected after 72 h when the cytopathic effect was evident. Cell debris was eliminated by low-speed centrifugation. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions either from 200 μ l of virus stock by using the RNA Instapur kit (Eurogentec, Seraing, Belgium), from 140 μ l of mouse sera by using the Trizol method (Invitrogen Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France), or from 140 μ l of human sera by using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). After precipitation with isopropanol, RNA was resuspended in 50 μ l of RNase-free water and stored at -80°C .

Design and synthesis of primers and fluorogenic probe. The available NS_s sequences published by Sall et al. (34) were aligned with DNAsis (version 2.6; Hitachi Software Engineering, Olivet, France), and Primer Premier software was used to design the primers and probe (version 4.04; Premier Biosoft International, Palo Alto, Calif.).

The primers S432 (5'-ATG ATG ACA TTA GAA GG GA3') and NS3m (5'-ATG CTG GGA AGT GAT GAG3'), which was modified from the NS3 primer (25), hybridize at positions 432 to 450 and 712 to 729, respectively, in genomic sense RNA, generating a 298-nucleotide DNA fragment. The primers were synthesized by Invitrogen Life Technologies. The TaqMan probe CRSSAr (5'-ATT GAC CTG TGC CTG TTGCC3') was synthesized by Oligo Genset (Paris, France). It contains a fluorescent reporter dye (6-carboxyfluorescein) at the 5' end and a fluorescent quencher dye (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) at the 3' end.

RT. The reaction was carried out at 37°C for 60 min with 10 μ l of RNA in a final volume of 30 μ l with 200 IU of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and 1 μM forward primer S432 under the conditions recommended by the supplier. Finally, the reaction mixture was heated at 95°C for 10 min to denature the enzyme.

Real-time PCR. The amplification reaction mixture contained 2 μ l of cDNA in a final volume of 20 μ l, and the reaction was carried out with the LightCycler-fast start DNA Master hybridization probes kit (Roche Diagnostics, Meylan, France), MgCl_2 at a 3.5 mM final concentration, the primers NS3m and S432 at 0.5 μM final concentrations, and the fluorogenic probe CRSSAr at a 0.5 μM final concentration. PCR was carried out in the LightCyclerR (Roche) for 45 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min.

Assay of antiviral activity of compounds in cell culture. Glycyrrhizin, ribavirin, and 6-azauridine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). Alpha 2b interferon (IFN- α 2b) was purchased from Schering-Plough (Herouville St-Clair, France).

Confluent layers of Vero cells in 24-well tissue culture plates were infected with 0.1 ml of diluted viral suspension (0.01 TCID₅₀ per cell), and 2 ml of maintenance medium containing the test compound at an appropriate concentration was added (4 wells per concentration). Five concentrations of the antiviral substances were tested in decreasing order from the maximally tolerated dose, which was the highest dose that did not cause microscopically detectable cytotoxic effects. Four wells were not treated with the drugs and served as controls. After 40 h of incubation, when a maximal infectious RVFV titer was reached in the untreated cells, intra- and extracellular RVFV were obtained by three cycles of freezing and thawing. The viral titer was determined in cell culture (TCID₅₀ per milliliter), and RNA was extracted and used to quantify the RVFV genome by real-time RT-PCR detection (RTD-PCR).

Statistical analysis. Statistical analysis of the data was carried out using one-way analysis of variance and Spearman's test.

RESULTS

Real-time RTD-PCR of RVFV. A traditional RT-PCR was already developed for the detection of RVFV in different specimens and proved to be efficient for the diagnosis of human cases during the 1998 Mauritanian outbreak (35). A high level of sensitivity was obtained in a nested RT-PCR assay, which

TABLE 1. Sensitivity and intraexperimental variability of RVFV strain MP12 synthetic RNA^a

No. of synthetic RNA ^b copies	Detection rate (%)	C_T (mean \pm SD)	CV (%)
5×10^6	100	17.79 ± 0.20	1.1
5×10^5	100	22.22 ± 0.31	1.4
5×10^4	100	25.98 ± 0.47	1.8
5×10^3	100	29.81 ± 0.06	0.2
5×10^2	100	32.70 ± 0.36	1.1
10^2	100	35.14 ± 0.26	0.7
5×10^1	25	37.25^c	ND ^d

^a Standard deviations and CV were calculated by using the C_T values.

^b RNA was diluted with water, and four identical samples were assayed in the same experiment.

^c Standard deviation was not determined.

^d ND, not determined.

detected 0.5 PFU of MP12 virus and was approximately 100-fold more sensitive than the simple one. In order to meet the requirements of rapid diagnosis and to avoid the risk of contamination, we employed the novel LightCycler instrument (Roche Diagnostics), which associates ultrarapid thermal cycling with TaqMan technology. New primers and a probe were designed in the highly conserved NS_s regions previously amplified in the classical RT-PCR.

For all experiments, the threshold limit was set above the noise band, and the threshold cycle (C_T) value was determined. The conditions of the amplification for salt and primer requirements were optimized with RVFV MP12 RNA; those yielding the lowest C_T values were selected. Thus, in our standard conditions, the concentrations of the forward and reverse primers and the probe were 500 nM, and the concentration of MgCl_2 was 3 mM.

The sensitivity and specificity of the RVFV genome detection were evaluated by using serial dilutions of a known amount of RNA transcribed in vitro from plasmid pGem-NS_s. The detection and quantification were linear over the range of concentrations examined, from at least 10^6 to 100 copies per run (data not shown). To test the reproducibility of the results, four aliquots of the same samples were independently amplified during the same cycles (Table 1). The intra-assay coefficient of variation (CV) calculated by using the C_T values (1) was found to vary between 0.9 and 3.0%, depending on the quantity of RNA. Moreover, the data reported in Table 1 indicate that the sensitivity limit was 50 to 100 copies.

To assay RNAs from RVFV stock, serial dilutions of samples in MP12-infected cell culture supernatants containing from 10^6 to 10 TCID₅₀ \cdot ml⁻¹ were reverse transcribed and amplified. We observed a linear response over 10^6 TCID₅₀ \cdot ml⁻¹, and the method could detect less than 10 TCID₅₀ \cdot ml⁻¹ of RVFV (Fig. 1). Moreover, we also tested variation with time by assaying the same samples in three different experiments carried out with a 1-day interval. The interassay CV calculated by using the C_T values was found to vary between 0.2 and 1.8%, depending on the quantity of RNA (Table 2).

To test the specificity of the amplification, we carried out the reaction with RNAs from RVFV strains clustered in the three groups referred to as West Africa, East-Central Africa, and Egypt (31, 32, 34). These strains were ZH501, ZH548, ArD38661, 74HB59, and clone 13. We also included RNAs

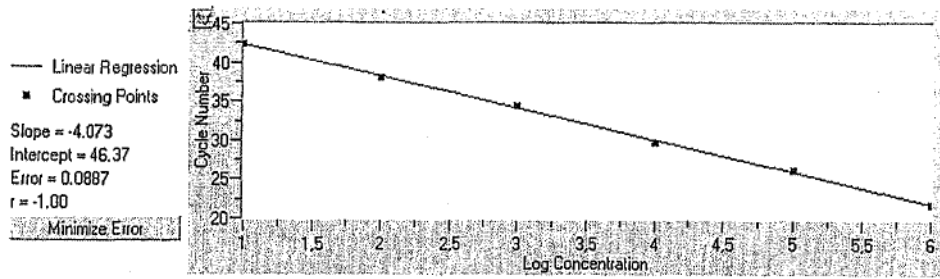


FIG. 1. Standard curve obtained with 10-fold serial dilutions of viral RVFV RNA. C_T values are plotted against different RNA amounts extracted from the infectious virus (titers running from 10^6 to 10 TCID₅₀ · ml⁻¹).

from closely related phleboviruses (Toscana, Icoaraci, and Belterra) and RNA extracted from uninfected AP61 or Vero cells (usually used for RVFV replication). All of the RVFV strains, except for the avirulent clone 13 strain lacking the amplified NS_s sequence (25), were detected, thus confirming that the primers and probe hybridized in conserved regions of the RVFV genome. No amplification was observed for other phleboviruses or cellular RNAs (not shown).

Since real-time RT-PCR is utilized for accurate quantification, we compared the infectious titer of MP12 stock, and the concentrations of genome equivalents were determined by using the calibration curve established with in vitro-transcribed RVFV RNA amplified during the same experiment. The concentration of S genome equivalent measured by real-time RT-PCR is approximately 3 to 3.5 log higher than the infectious virus titer measured in cell culture (Table 3).

Because real-time RT-PCR is of special importance for diagnosis, we evaluated the method by using sera from mice experimentally infected with the virulent strain ZH548 and collected at different times postinoculation. Viremia was determined by plaque assay, and after RNA extraction and amplification, the concentrations of genome equivalents were calculated (Table 3). The values obtained were in good correlation with the infectious titers. In addition, seven human serum samples artificially contaminated with the MP12 strain were successfully amplified (data not shown).

Evaluation of antiviral activity. The screening of antiviral agents is generally tedious as it requires testing a wide range of drug concentrations followed by a large number of virus titrations. Thus, we used real-time RT-PCR to quantify RVFV yielded in the presence of the drugs. We tested ribavirin, IFN- α , 6-azauridine, and glycyrrhizin, which are already commercialized and used in patients for their antiviral or antitumor activity. They were known to inhibit the in vitro replication of

another phlebovirus, sandfly fever Sicilian virus (SFSV) (5), and ribavirin was previously shown to have an inhibitory effect on RVFV replication in infected cells (27).

A preliminary experiment was performed to determine the maximal tolerated dose of each drug. At this concentration, these compounds inhibited virus production by >4.0 log (Table 4). The effects of decreasing concentrations were determined by two methods, titration of RVFV by TCID₅₀ and RT-PCR of genome equivalent (Fig. 2). At the lowest concentrations tested, ribavirin (62.5 μ g · ml⁻¹), IFN- α (1 IU · ml⁻¹), and 6-azauridine (0.3 μ g · ml⁻¹) were still active. The virus titer reductions were 1.9, 0.5, and 0.5 log, respectively, and the genome titer reductions were 1.4, 0.5, and 0.6 log, respectively. Glycyrrhizin had lower antiviral activity; viral replication was inhibited only at relatively high concentrations.

IFN- α and ribavirin caused a concentration-dependent reduction in the virus yield (by analysis of variance, $P < 0.5$). The reductions in virus titer and in genome equivalent were analyzed statistically by using the Spearman test. The two methods led to strongly correlated results ($P < 0.01$). Altogether, our data clearly indicate that this method should be recommended to detect and quantify viral replication.

DISCUSSION

Currently, besides recognizing clinical and biological features, the diagnosis of a human RFV infection is based on the detection of specific immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies or virus isolation in mammalian or mosquito cells or in the brains of suckling mice (7, 13, 22). Recently Sall et al. described a single-tube RT-PCR that allows for the detection of RVFV in clinical samples (35).

The RT-PCR is currently being used as a method of detec-

TABLE 2. Interexperimental variability of RVFV RNA quantification^a

Sample no.	No. of RVFV RNA copies/sample on day:			No. of copies/sample (mean \pm SD)	CV (%)
	1	2	3		
1	3.5×10^7	1.8×10^7	3.2×10^7	$2.8 \times 10^7 \pm 0.20$	0.9
2	1.2×10^7	6.7×10^6	1.4×10^7	$1.1 \times 10^7 \pm 0.13$	0.55
3	1.6×10^7	6.7×10^6	1.5×10^7	$1.2 \times 10^7 \pm 0.26$	1.1
4	7.7×10^7	3.1×10^7	4.8×10^7	$5.2 \times 10^7 \pm 0.66$	3.0
5 (blank)	Not detected	Not detected	Not detected		

^a Four identical samples from the supernatants of Vero cells infected with RVFV strain MP12 were analyzed in four separate experiments with a 1-day interval. Synthetic RNAs were included in each experiment to determine the RNA copy numbers. CV were calculated by using the C_T values.

TABLE 3. Real-time quantification of RVFV RNA extracted from MP12-infected Vero cell supernatant or from sera of infected mice collected at different times postinfection

Source, infection status, and time (h) postinfection	Virus titer ^a	Quantification (log RNA copies · ml ⁻¹)
Vero cell supernatant		
Infected with MP12	6.0	9.0
	5.6	8.5
	4.6	7.5
	3.4	6.5
	1.6	5.1
	1.7	5.1
Not infected	Not detected	Not detected
Mouse sera		
Infected with 2H548		
24	4.6	6.8
33	5.9	8.6
48	>8.5	10.0
Not infected	Not detected	Not detected

^a Virus titers are expressed in PFU per milliliter for mouse serum samples and in TCID₅₀ per milliliter for Vero cell samples.

tion for a great number of arboviruses, which facilitates phylogenetic studies (14, 36).

Here we describe, for the first time, a method of RTD-PCR which allows for the identification and quantification of RVFV RNA. This new technique is a significant improvement in PCR cycling, since it is a closed system in which the formation of amplified product is measured in real time, avoiding risks of contamination. It has been used for immediate identification of a viral agent during the early acute phase of illness and for monitoring the virus load in treated patients infected by the hepatitis B and C viruses and by the herpes and cytomegaloviruses (1, 12, 15, 20, 40). Moreover, when compared to other quantification methods, RTD-PCR was often revealed to be more sensitive (1, 26).

The sensitivity of the assay is dependent on several factors, such as the sample source, the nucleic acid extraction method, and the thermal cycling conditions. In our hands, RNA extraction with phenol chloroform led to better results than adsorption elution on the column of the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen). Likewise, we increased the sensitivity of the RT step by adding glycogen to the samples. The sensitivity of this RVFV assay was evaluated using synthetic and viral RNA and was shown to be less than 100 RNA copies per run or less than 10 TCID₅₀ · ml⁻¹, which is equivalent to the traditional RT-PCR already described (11, 35). It is worth noting that the genomic titer measured by real-time RT-PCR was found to be between 2 and 3 log higher than the virus titer measured in cell culture. For the dengue virus, it was also found that each infectious PFU represents at least 100 or more genomic equivalents (10), and we found a 3 log difference with the Puumala virus (8). This difference may be due to the presence of non-infectious viral RNA, or the RVFV S segment may be over-expressed in the cells.

The specificity of the real-time RT-PCR was successfully tested with different RVFV clusters and the closely related phleboviruses Belterra, Toscana, and Icoaraci, and as ex-

pected, the method failed to detect the clone 13 strain. The use of a cDNA synthesis step allows us to overcome the limitations of *Tth*. Theoretically, RTD-PCR is a one-step procedure employing a single enzyme, the *Tth* provided by the LightCycler RNA Master hybridization probe (Roche Diagnostics). This enzyme displays RT activity at a recommended temperature of 61°C and polymerase activity at a recommended temperature of 72°C. However, we found that these conditions were sub-optimal. Other kits now in development will probably overcome this problem.

In order to screen potent antiviral drugs in cell culture, it is necessary to appreciate their ability to inhibit virus replication at noncytotoxic concentrations and then to determine their concentration-dependent activity. As a reference method, the titration of infectious virus is currently used to evaluate antiviral activity. It requires a time-consuming cell culture as support for the quantification of the virus either by evaluating PFU per milliliter or TCID₅₀ milliliter (5, 38). In this study, we obtained a good correlation when viral genomes were quantified by RTD-PCR. The latter method reduced the time required for an experiment from 1 week to 4 h, and it avoided manipulation of dangerous infectious material which required a biosafety level 3 laboratory.

Among several antiviral compounds, four were selected for their inhibitory effects on RVFV replication and for their abilities to be used in human therapeutics. Ribavirin, 6-azauridine, and IFN- α were proven to be very active at low concentrations

TABLE 4. Effects of antiviral compounds on RVFV production assessed by infectious virus assay or genome detection

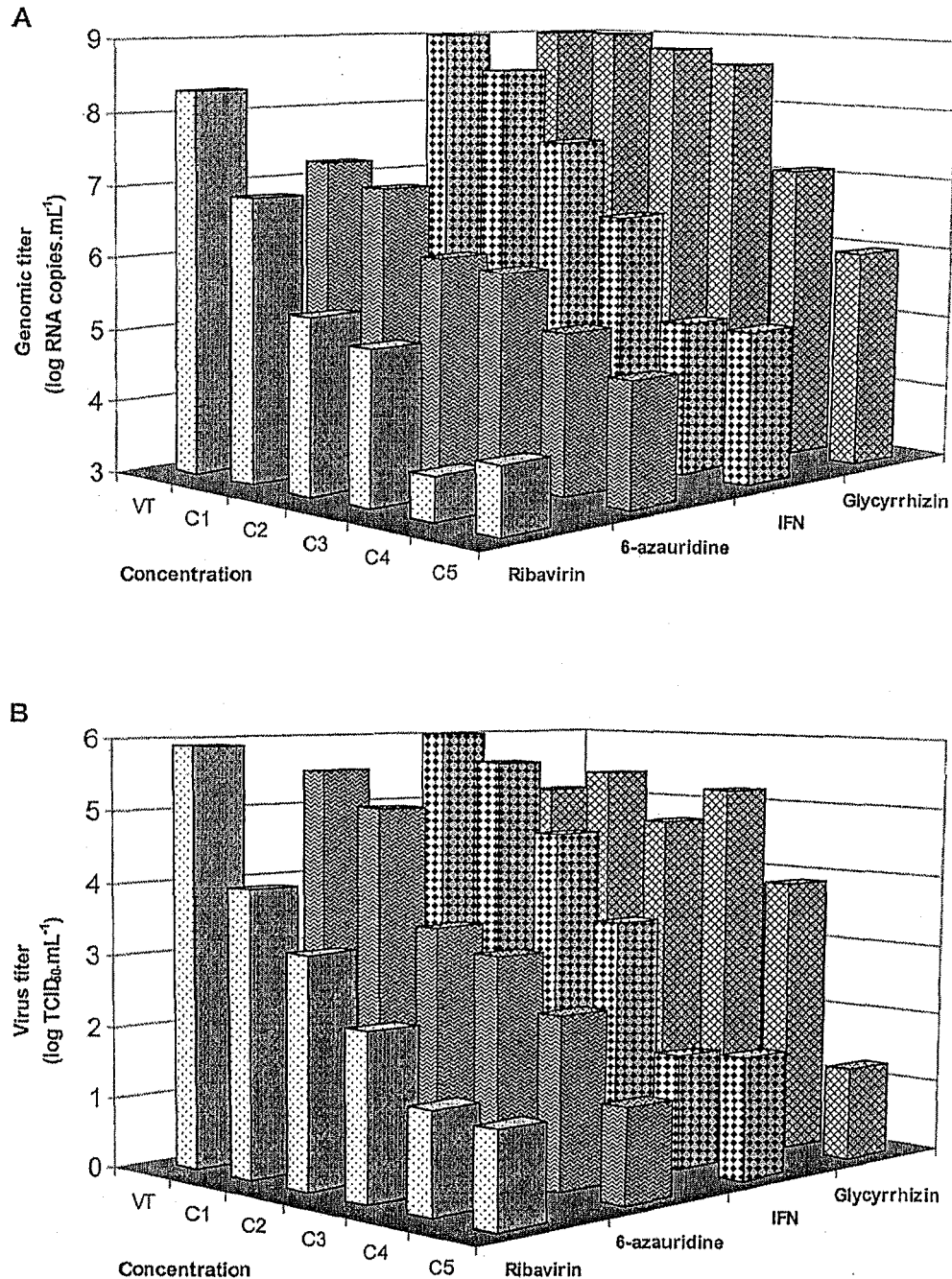
Compound	Final concentration ^d	Virus titer reduction ^b (log TCID ₅₀ · ml ⁻¹)	Genomic titer reduction ^b (log RNA copies · ml ⁻¹)
Glycyrrhizin	156	NR ^a	NR
	312	NR	NR
	625	NR	NR
	1,250	1.2	2.0
	2,500	>4.1 ^c	3.0
IFN- α	1	0.5	0.5
	10	1.5	1.5
	100	2.7	2.5
	1,000	4.5	3.9
	10,000	4.4	3.9
Ribavirin	62.5	1.9	1.4
	125	2.7	>2.9
	250	3.6	>3.2
	500	>4.6	>4.7
	1,000	>4.6	>4.4
6-Azauridine	0.3	0.5	0.6
	0.6	2.1	1.5
	1.3	2.4	1.7
	2.5	3.1	2.2
	5.0	>4.5	2.6

^a NR, no reduction measured.

^b Reduction in virus titers and genome concentration between RVFV yields in treated and untreated Vero cells.

^c Greater than signs are used if the titers obtained with an antiviral compound were below the sensitivity threshold.

^d Concentrations of glycyrrhizin, ribavirin, and 6-azauridine are expressed in micrograms per milliliter. Concentrations of IFN- α are expressed in international units per milliliter.



AQ: G FIG. 2. Effect of antiviral compounds on the RVFV (strain MP12) yield measured by either genomic (A) or virus (B) titer. Antiviral compound concentrations, increasing from C₁ to C₅, are given in Table 4. VT is the virus control (infected nontreated cells).

and led to a reduction of the virus titer depending on the concentration, whereas glycyrrhizin became active at the highest concentrations tested. Among these compounds, only ribavirin and IFN- α had previously been investigated for their effects on RVFV (23, 27). Intravenous ribavirin has been shown to effectively treat other viral hemorrhagic fevers, including Lassa fever, hemorrhagic fever with renal syndrome, and Crimean-Congo hemorrhagic fever. Furthermore, the Saudi Arabian Ministry of Health recently evaluated the feasibility of a randomized, placebo-controlled trial using intrave-

nous ribavirin in patients with suspected severe RVF infection (4). 6-Azauridine and glycyrrhizin were shown to be effective against a related phlebovirus, SFSV. It would be interesting to evaluate the efficacy of a combination of two or three compounds as was done for SFSV (5).

In conclusion, RTD-PCR detection and quantification of RVFV would be useful as a routine diagnostic test for identifying the virus in the early stage of the disease and for following up antiviral therapy. The technique should be used now in large field experiments to confirm its clinical ability. It also

gives a new way to estimate the in vitro efficiency of potential antiviral substances and to detect unusual antiviral resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from the Service de Santé des Armées and from the Délégation Générale à l'Armement (grant no. 00CO014; PEA 980-814).

We thank Corinne Rothlisberger, Danielle Gratier, Josette Guimet, Henri Blancquaert, and Pierre Vialat for technical assistance.

REFERENCES

- Abe, A., K. Inoue, T. Tanaka, J. Kato, N. Kajiyama, R. Kawaguchi, S. Tanaka, M. Yoshida, and M. Kohara. 1999. Quantitation of hepatitis B virus genome DNA by real-time detection PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:2899-2903.
- Ahmad, K. 2000. More deaths from Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen. *Lancet* 356:1422.
- Caplen, H., C. J. Peters, and D. H. L. Bishop. 1985. Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development. *J. Gen. Virol.* 66:2271-2277.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Outbreak of Rift Valley fever—Saudi Arabia, August-October, 2000. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 49:905-908.
- Crance, J. M., D. Gratier, J. Guimet, and A. Jouan. 1997. Inhibition of sandfly fever Sicilian virus (*Phlebovirus*) replication *in vitro* by antiviral compounds. *Res. Virol.* 148:353-365.
- Daubney, R., J. R. Hudson, and P. C. Garnham. 1931. Enzootic hepatitis or Rift Valley fever. An undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J. Pathol. Bacteriol.* 34:545-579.
- Digoutte, J. P., A. Jouan, B. Le Guenno, O. Riou, B. Philippe, J. Meegan, T. G. Ksiazek, and C. J. Peters. 1989. Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudocinctellaris* cells: comparison with other diagnostic methods. *Res. Virol.* 140:31-41.
- Garin, D., C. Peyrefitte, J. M. Crance, A. Le Faou, A. Jouan, and M. Bouloy. 2001. Highly sensitive Taqman PCR detection of Puumala hantavirus. *Microbes Infect.* 3:739-745.
- Giorgi, C. 1996. Molecular biology of phleboviruses, p. 105-128. *In* R. M. Elliott (ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Houng, H. S. H., D. Hritz, and N. Kanesa-Thanan. 2000. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J. Virol. Methods* 86:1-11.
- Ibrahim, M. S., M. J. Turell, F. K. Knauer, and R. S. Loft. 1997. Detection of Rift Valley fever in mosquitoes by RT-PCR. *Mol. Cell. Probes* 11:49-53.
- Kessler, H. H., G. Mühlbauer, B. Rinner, E. Stelzl, A. M. Berger, H. W. Dörr, B. Santner, E. Marth, and H. Rabenau. 2000. Detection of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:2638-2642.
- Knauer, F. K., J. M. Meegan, A. Jouan, T. G. Ksiazek, B. Le Guenno, J. L. Sarthou, C. J. Peters, and J. P. Digoutte. 1989. Assessment of an rDNA probe filter hybridization assay for the detection of Rift Valley fever virus RNA in human serum samples from the Mauritanian epidemic. *Res. Virol.* 140:47-57.
- Kuno, G. 1998. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J. Virol. Methods* 72:27-41.
- Lallemant, F., N. Desire, W. Rozenbaum, J. C. Nicolas, and V. Marechal. 2000. Quantitative analysis of human herpes virus 8 viral load using a real-time PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38:1404-1408.
- Laughlin, L. W., J. M. Meegan, L. J. Strausbaugh, D. M. Morens, and R. H. Watten. 1979. Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of illness. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.* 73:630-633.
- Linthicum, K. J., F. G. Davies, A. Kairo, and C. L. Bailey. 1985. Rift Valley fever virus (family *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*). Isolations from *Diptera* collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J. Hyg. (London)* 95:197-205.
- Linthicum, K. J., A. Anyamba, C. J. Tucker, P. W. Kelley, M. F. Myers, and C. J. Peters. 1999. Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya. *Science* 285:397-400.
- Lopez, N., R. Muller, C. Prehaud, and M. Bouloy. 1995. The L protein of Rift Valley Fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J. Virol.* 69:3972-3979.
- Machida, U., M. Kami, T. Fukui, Y. Kazuyama, M. Kinoshita, Y. Tanaka, Y. Kanda, S. Ogawa, H. Honda, S. Chiba, K. Mitani, Y. Muto, K. Osumi, S. Kimura, and H. Hirai. 2000. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 38:2536-2542.
- Meegan, J. M., and C. L. Bailey. 1988. Rift Valley fever, p. 51-76. *In* T. P. Monath (ed.), *The arboviruses: epidemiology and ecology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Meegan, J. M., B. Le Guenno, T. Ksiazek, A. Jouan, F. Knauer, J. P. Digoutte, and C. J. Peters. 1989. Rapid diagnosis of Rift Valley fever: a comparison of methods for the direct detection of viral antigen in human sera. *Res. Virol.* 140:59-65.
- Morrill, J. C., C. W. Czarniecki, and C. J. Peters. 1991. Recombinant human interferon- γ modulates Rift Valley fever virus infection in the rhesus monkey. *J. Interferon Res.* 11:297-304.
- Morrill, J. C., and D. J. McClain. 1996. Epidemiology and pathogenesis of Rift Valley fever and other phleboviruses, p. 281-293. *In* R. M. Elliott (ed.), *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Muller, R., J. F. Saluzzo, N. Lopez, T. Dreier, M. Turell, J. Smith, and M. Bouloy. 1995. Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:405-411.
- Pas, S. D., E. Fries, R. A. De Mans, A. D. M. E. Osterhaus, and H. G. M. Niesters. 2000. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J. Clin. Microbiol.* 38:2897-2901.
- Peters, C. J., J. A. Reynolds, T. W. Slone, D. E. Jones, and E. L. Stephen. 1986. Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator. *Antivir. Res.* 6:285-297.
- Peters, C. J., and K. J. Linthicum. 1994. Rift Valley fever, p. 125-138. *In* ●●● (ed.), *Handbook series in zoonoses. Section B: viral zoonoses*. CRC Press, Boca Raton, Fla. AQ: E
- Pittman, P. R., C. T. Liu, T. L. Cannon, R. S. Makuch, J. A. Mangiafico, P. H. Gibbs, and C. J. Peters. 2000. Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience. *Vaccine* 18:181-189.
- Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497. AQ: F
- Sall, A. A., P. M. de A. Zanotto, H. G. Zeller, J. P. Digoutte, Y. Thiongane, and M. Bouloy. 1997. Variability of the NSs protein among Rift Valley fever virus isolates. *J. Gen. Virol.* 78:2853-2858.
- Sall, A. A., P. M. de A. Zanotto, O. K. Sene, and M. Bouloy. 1998. Molecular epidemiology and emergence of Rift Valley fever. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93:609-614.
- Sall, A. A., P. M. de A. Zanotto, P. Vialat, O. K. Sene, and M. Bouloy. 1998. Origin of 1997-98 Rift Valley fever outbreak in East Africa. *Lancet* 352:1596-1597.
- Sall, A. A., P. M. de A. Zanotto, O. K. Sene, H. G. Zeller, J. P. Digoutte, Y. Thiongane, and M. Bouloy. 1999. Genetic reassortment of Rift Valley Fever virus in nature. *J. Virol.* 73:8196-8200.
- Sall, A. A., J. Thonnon, O. K. Sene, A. Fall, M. Ndiaye, B. Baudez, C. Mathiot, and M. Bouloy. 2001. Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol. Methods* 91:85-92.
- Scaramozzino, N., J.-M. Crance, A. Jouan, D. A. DeBriel, F. Stoll, and D. Garin. 2001. Comparison of *Flavivirus* universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* 39:1922-1927.
- Schmaljohann, C. 1996. Bunyaviridae: the viruses and their replication, p. 1447-1471. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Sidwell, R. W., J. H. Huffman, B. B. Barnett, and D. Y. Pifat. 1988. In vitro and in vivo *Phlebovirus* inhibition by ribavirin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:331-336.
- Swanepoel, R., and J. A. W. Coetzer. 1994. Rift Valley fever, p. 688-717. *In* J. A. W. Coetzer, G. R. Thompson, and R. C. Tustin (ed.), *Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa*. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa.
- Takeuchi, T., A. Katsume, T. Tanaka, A. Abe, K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, R. Kawaguchi, S. Tanaka, and M. Kohara. 1999. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 116:636-642.
- Zeller, H., and M. Bouloy. 2000. Infections by viruses of the families *Bunyaviridae* and *Filoviridae*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 19:79-91.



Résumé

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV), du genre *phlébovirus* (famille des *Bunyaviridae*) est un virus enveloppé à ARN négatif tri segmenté. Jusqu'en 2000, la circulation du RVFV était limitée au continent Africain, mais la récente épidémie mortelle qui a touché la Péninsule d'Arabie illustre de manière dramatique la nécessité de disposer de méthodes de diagnostic rapides, de traitements efficaces et de moyens prophylactiques. Une méthode pour quantifier le brin d'ARN S viral par RT-PCR en temps réel utilisant la technologie TaqMan® et ciblant le gène codant pour la protéine NSs a été développée. Les amorces et la sonde correspondantes ont été dessinées. Après optimisation de la réaction d'amplification et mise au point d'une courbe d'étalonnage à partir d'un ARN synthétique transcrit *in vitro* d'un plasmide, la RT-PCR en temps réel a été testée sur des échantillons d'ARN viral extrait de cellules Vero. La méthode s'est révélée spécifique de RVFV et a été utilisée avec succès pour détecter le génome viral dans des sérums d'animaux infectés par RVFV, mais aussi pour évaluer l'efficacité de plusieurs substances antivirales (ribavirine, IFN α , 6-azauridine et glycyrrhizine). Il a également été possible de détecter le génome viral dans des sérums humains artificiellement contaminés. Les résultats obtenus ont montré une forte corrélation entre les titres infectieux du virus et les quantités de génome viral mesurées par RT-PCR en temps réel. Cette nouvelle méthode pourrait être intéressante pour le diagnostic rapide et pour le criblage de nouvelles molécules antivirales car elle est sensible, permet un gain de temps et ne nécessite pas l'amplification et la manipulation de matériels infectieux. Elle pourrait être utilisée pour le suivi thérapeutique et la mesure de la charge virale.