

Mémoire de Maîtrise en médecine No 206

Développement d'un Test Sérologique Contre le Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire

Etudiant

Damien Schaffner

Tuteur

Prof. Stefan Kunz
Institut de Microbiologie, CHUV

Expert

Prof. Pascal Meylan
Service Maladies Infectieuses &
Institut de Microbiologie, CHUV

Lausanne, le 08 décembre 2012

Table des matières

LEXIQUE DES ABRÉVIATIONS.....	- 3 -
1 INTRODUCTION	- 4 -
1.1 Structure et génome.....	- 5 -
1.2 Infection chez l'Homme.....	- 6 -
1.3 Traitement	- 6 -
1.4 Diagnostic de LCMV	- 7 -
2 OBJECTIFS	- 9 -
3 RÉSULTATS	- 10 -
3.1 Production des antigènes	- 10 -
3.2 Optimisation du coating des différentes NP recombinantes.....	- 11 -
3.3 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant un anticorps monoclonal	- 12 -
3.4 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes en utilisant des sérums certifiés	- 13 -
3.5 Comparaison de la sensibilité par technique ELISA versus technique IFA.....	- 14 -
3.6 Comparaison de titres ELISA mesurés entre système « avec » et système « sans » amplification	- 15 -
3.7 Contrôle qualité de la 2 ^{ème} extraction de NP et contrôle DeltaP	- 15 -
3.8 Adaptation du test ELISA au sérum humain	- 16 -
3.9 Test de spécificité de notre ELISA.....	- 17 -
4 DISCUSSION.....	- 20 -
5 MATÉRIELS ET MÉTHODES	- 22 -
5.1 Production et purification du virus	- 22 -
5.2 Titrage du virus	- 22 -
5.3 Production et contrôle qualité des NP LCMV recombinantes	- 23 -
5.4 Protocole standard pour Western-blotting	- 24 -
5.5 Protocole standard pour ELISA	- 24 -
5.6 Optimisation du coating des NP LCMV recombinantes.....	- 24 -
5.7 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant un anticorps monoclonal	- 25 -
5.8 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant des sérums référence de cochon d'Inde	- 25 -
5.9 Comparaison de la sensibilité par technique ELISA versus technique IFA.....	- 25 -
5.10 Comparaison de titres ELISA mesurés entre système « avec » et système « sans » amplification	- 26 -
5.11 Contrôle qualité de la 2 ^{ème} extraction de NP et contrôle DeltaP	- 27 -
5.12 Adaptation du test ELISA au sérum humain	- 27 -
5.13 Test de spécificité de notre ELISA	- 27 -
6 REMERCIEMENTS	- 28 -
7 RÉFÉRENCES	- 29 -

LEXIQUE DES ABRÉVIATIONS

A549	human lung epithelial cell line A549
Ac I	anticorps primaire
Ac II	anticorps secondaire
ARN	acide ribonucléique
BHK21	baby hamster kidney cell 21
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GP	glycoprotéine
HRP	horseradish peroxidase
IFA	immunofluorescence assay
IgA	immunoglobuline de type A
IgD	immunoglobuline de type D
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
LCMV	virus de la chorioméningite lymphocytaire
mAb	anticorps monoclonal
NP	nucléoprotéine
OD	densité optique
SB	sample buffer
SNC	système nerveux central

Mots clés

Français : sérologie – virus de la chorioméningite lymphocytaire – LCMV – ELISA – diagnostic
Anglais : serologie – lymphocytic choriomeningitis virus – LCMV – ELISA - diagnostic

1 INTRODUCTION

Les Arenavirus sont une famille de virus à ARN très diversifiée avec plus de 23 espèces recensées dans le monde, divisées en deux Clades majeures (Emonet et al., 2009). Ils sont classifiés en Arenavirus du Nouveau Monde versus de l'Ancien Monde (Buchmeier, de la Torre, and Peters, 2007) (Fig. 1). Parmi les Arenavirus, sept sont connus pour être les agents causales de fièvres hémorragiques foudroyantes : Les virus Lassa, Junin, Machupo, Guanarito, Sabia, Chapare et Lujo. Les Arenavirus infectent, de façon spécifique, des espèces de rongeurs qui sont le réservoir naturel déterminant ainsi leur distribution géographique (Clegg, 2002). On retrouve le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) à la fois en Europe et aux Amériques. Le rongeur infecté est le vecteur de transmission à l'Homme. Les maladies associées aux infections par les Arenavirus hémorragiques ont un haut taux de mortalité allant de 15 à 30% et sont à haut risque épidémiologique en raison de l'absence de vaccin et de traitement efficace. Pour ces raisons, ces Arenavirus sont classifiés comme pathogènes à haut risque par le centre pour le contrôle des maladies (CDC) (Borio et al., 2002).

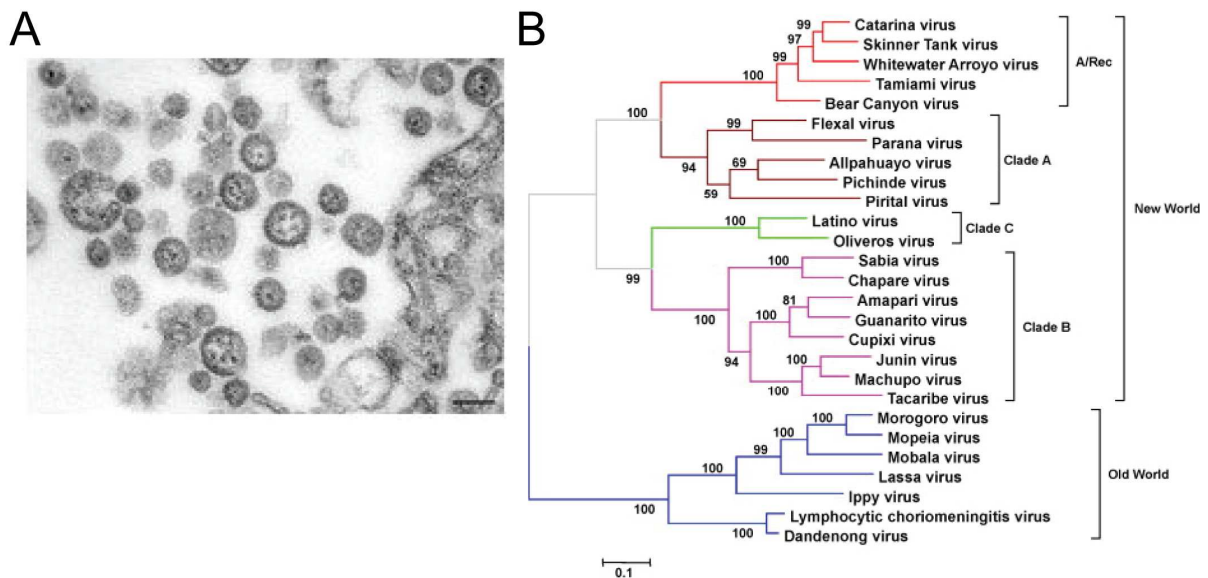


Figure 1: Les Arenavirus. (A) Microscopie électronique montrant la morphologie des Arenavirus. Notez l'apparence des particules fines au sein des virions, qui représentent les ribosomes; **(B)** Arbre phylogénétique des Arenavirus basé sur l'analyse de la séquence de la nucléoprotéine.

LCMV fut le premier Arenavirus découvert et est le mieux caractérisé de sa famille. Il fut isolé en 1933 à partir d'un patient par Armstrong et Lillie lors d'une épidémie d'encéphalite à St. Luis (Buchmeier, de la Torre, and Peters, 2007). LCMV est un virus enveloppé, simple brin d'ARN à polarité négative, ayant un génome bisegmenté. Le réservoir naturel de LCMV est la souris *Mus Musculus* (souris commune) ainsi que d'autres espèces de rongeurs qui peuvent servir d'hôtes occasionnels tel que le rat (*Rattus Norvegicus*), le hamster et le cochon d'Inde (Clegg, 2002). LCMV est présent chez les rongeurs d'Europe et des Amériques. LCMV est un virus non-cytolytique capable d'établir une infection persistante dans les cellules mammifères. Sa présence chez la souris est de type infection chronique si la primo-infection se passe *in utero* ou en période périnatale par transmission verticale (Buchmeier, de la Torre, and Peters, 2007). Dans ce cas de figure, la souris nouveau-né ne manifeste pas de signes de maladie malgré un haut titre de virus présent dans tous

1.2 Infection chez l'Homme

Les données sur la séroprévalence de LCMV chez l'homme sont limitées. Selon différentes études, la séroprévalence varie entre 3-20% (Childs et al., 1992; Childs et al., 1991; Lledo et al., 2003a; Stephensen et al., 1992a). Le temps d'incubation est de 1 à 3 semaines et provoque une symptomatologie, chez l'Homme immunocompétent, qui peut se présenter en deux temps. La durée de la symptomatologie bi-phasique est de 1 à 3 semaines (Meyer et al., 1960). La 1^{ère} phase est caractérisée par un syndrome viral non-spécifique (myalgie, fièvre, malaise, maux de tête, anorexie, nausée et vomissements). Classiquement, ces symptômes s'atténuent après quelques jours et, chez une minorité de cas, peuvent être suivis par la 2^{ème} phase qui, quant à elle, est caractérisée par une atteinte du système nerveux central (SNC). Les symptômes de cette phase « SNC » sont ceux de la méningite aseptique ou de la méningo-encéphalite (fièvre, maux de tête, rigidité nucale, photophobie et vomissements). Parmi les patients hospitalisés pour une méningite aseptique dans un hôpital de Washington DC entre 1941 et 1958, 10% étaient associés à LCMV (Buchmeier, de la Torre, and Peters, 2007). D'autres études plus récentes nous ont montré les séroprévalences suivantes : Espagne 1.7% (Lledo et al., 2003b), Hollande 2.9% (Elbers et al., 1999), Etats-Unis 3.5-5.1% (Milazzo, Campbell, and Fulhorst, 2011; Stephensen et al., 1992b). La plupart des infections à LCMV, chez l'Homme immunocompétent, sont soit asymptomatiques ou ont une manifestation de la maladie limitée à la 1^{ère} phase. La grande majorité des patients récupèrent sans séquelle. L'infection à LCMV via la transplantation d'un organe solide infecté peut être associée à un développement sévère (Fischer et al., 2006; Palacios et al., 2008). Dans ce cas, les receveurs ont développé de la fièvre, une lymphopénie et une léthargie. Ces symptômes non-spécifiques sont suivis par une insuffisance multi-organique aboutissant à un état de choc. Les maladies associées aux infections LCMV par voie de transplantation ont un très haut taux de mortalité situé entre 80-100%.

La primo-infection à LCMV, lors de la grossesse, peut avoir des effets néfastes sur la santé du fœtus et du nouveau né (Barton and Mets, 1999; Barton, Mets, and Beauchamp, 2002). Si l'infection se produit lors du 1^{er} trimestre de grossesse, il y a un risque augmenté de fausse-couche (Barton and Mets, 2001). En revanche, l'infection lors du 2^{ème} ou 3^{ème} trimestre, est liée à de sévères anomalies du SNC (hydrocéphalie, retard psychomoteur, macro- ou microcéphalie, cécité, sténose de l'aqueduc souvent associée à une calcification périventriculaire, chorioretinite) (Barton and Hyndman, 2000; Barton and Mets, 1999; Barton and Mets, 2001; Barton, Mets, and Beauchamp, 2002; Bonthius, 2009; Greenhow and Weintrub, 2003; Mets et al., 2000). Cette liste de manifestations cliniques n'est certainement pas exhaustive car elle regroupe les signes retrouvés chez les enfants TORCHS négatif (Toxoplasmose, Rubéole, Cytomégalovirus, Herpes virus et Syphilis) chez qui on a mis en évidence une infection à LCMV. L'étude inverse, analysant les signes ou leur absence lors d'une sérologie positive, n'a jamais été conduite car il n'existait pas de tests peu coûteux et réalisables sur de grands échantillons de patients (Barton, Mets, and Beauchamp, 2002).

1.3 Traitement

A l'heure actuelle, il n'existe pas de médicament spécifique enregistré pour le traitement de la chorioméningite lymphocytaire (CML). La seule molécule qui a été utilisée lors de la prise en charge des patients greffés qui ont été infectés par LCMV était la ribavirine (Copegus®/Rebetol®). La ribavirine est un analogue nucléosidique de la guanosine et est enregistrée comme traitement

d'infection à d'autres Arenavirus (Lassa/Junin) (Lee, Pasquato, and Kunz, 2010; Parker, 2005). La ribavirine ne doit pas être administrée sans une contraception efficace pour les deux sexes, durant tout le traitement et les 6 mois suivant l'arrêt de ce dernier, en raison de l'effet tératogène et mutagène de la molécule. Des résidus de la molécule ont été retrouvés dans le sperme des animaux testés et comme nous ne savons pas si la ribavirine contenue dans le sperme peut provoquer les effets tératogènes connus, il doit être conseillé au patient de sexe masculin d'utiliser un préservatif durant la période de traitement ainsi que les 6 mois suivant l'arrêt de ce dernier. Il est donc éthiquement impossible de traiter une femme enceinte infectée par LCMV avec ce médicament. La ribavirine possède aussi plusieurs effets secondaires dont le principal est l'anémie hémolytique (contre-indiqué en cas de thalassémie ou de drépanocytose) qu'on retrouve chez ~15 % des patients. De plus, l'effet de la ribavirine chez les patients greffés n'a pas été spécifiquement étudié.

Dans un contexte de maladie ré-émergente dont on ne connaît ni l'incidence, ni la prévalence exacte, dont le tableau clinique n'a pas été clairement défini et pour laquelle on ne dispose pas de traitement pour une des sous-populations à risque, le diagnostic joue un rôle important. Celui-ci permet de connaître premièrement, l'incidence ainsi que la prévalence du virus, deuxièmement, de mieux caractériser le tableau clinique et troisièmement, mieux identifier et comprendre les sources d'infection afin de pouvoir éventuellement prévenir l'exposition des femmes enceintes à ce virus nocif pour leur enfant.

1.4 Diagnostic de LCMV

A l'heure actuelle, il existe principalement deux techniques de diagnostic de l'infection à LCMV. La technique de réaction en chaîne par polymérisation (PCR) reconnaît et amplifie, *in vitro*, des séquences d'ARN virale. Cette amplification génique permet de détecter de faibles quantités de virus. Pour effectuer ce test, il est donc capital que le virus soit présent chez l'hôte et accessible au moment de la prise de l'échantillon. Les deux fenêtres diagnostiques possibles étant la primo-infection, lors de la virémie primaire qui mène à la propagation hématogène, et lors de la virémie secondaire suite à la réplication virale dans divers organes tel que le foie, la rate etc. Un avantage de cette technique est qu'elle permet une quantification de la charge virale présente dans l'échantillon. En revanche, son désavantage est qu'il est obligatoire de connaître une séquence ARN spécifique au virus pour pouvoir le détecter. Il n'est donc pas possible de détecter une variante du virus sauf si on utilise différents primers pour reconnaître la séquence génomique spécifique avec un format de test multiplex. De plus, une nouvelle mutation dans la région spécifique du génome détectée par le primer induirait une diminution de la sensibilité du test. En collaboration avec le Prof. Laurent Kaiser du Centre Régional pour les Virus Emergents de l'Hôpital Universitaire Genève (HUG) notre laboratoire a établi un test PCR pour LCMV couvrant les souches LCMV connues (Cordey et al., 2011).

La seconde technique est l'immunofluorescence assay (IFA). Cette technique consiste à infecter des cellules *in vitro* avec une souche référence de LCMV. Une fois l'infection des cellules réalisée, les cellules sont fixées et perméabilisées. Le sérum du patient est ajouté aux cellules. Si le patient est séropositif, ses anticorps spécifiques vont se lier aux protéines virales dans les cellules infectées. Après lavage, l'anticorps du patient lié à la protéine virale est détecté avec un anticorps secondaire lié à un fluorochrome. Le résultat est détecté par lecture subjective du niveau de fluorescence à l'aide d'un microscope à fluorescence. Cette technique a donc l'avantage de mettre en évidence la séropositivité - respectivement séronégativité - du patient. La semi-quantification nous permet aussi d'estimer, de manière plus ou moins précise, la réponse immunitaire humorale du

patient. Cependant, les désavantages de l'IFA sont nombreux. Premièrement, elle nécessite la culture de cellules infectées par le virus. Cette étape prend du temps et peut donc péjorer le pronostic du patient. Une alternative à cela serait d'avoir constamment de telles cellules en culture mais en dehors d'une zone épidémique, cela représenterait un risque pour la biosécurité et un coût non-négligeable. De plus, la lecture du résultat étant subjective, il pourrait varier d'un opérateur à l'autre, d'un laboratoire à l'autre. Il est donc important d'utiliser une technique sûre biologiquement, peu coûteuse, rapide et surtout dont la lecture du résultat est objective. La technique enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) regroupant, quant à elle, tous ces critères, a été choisie pour élaborer ce test. L'avantage des trois techniques présentées ci-dessus (PCR, IFA, ELISA) est qu'elles peuvent toutes être utilisées aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (cela nécessite quelques modifications du protocole pour les techniques IFA et ELISA). Cet aspect est capital si on veut pouvoir suivre l'évolution de la prévalence du virus chez l'Homme ainsi qu'au sein des espèces réservoirs.

2 OBJECTIFS

Le but de notre projet est le développement d'un test sérologique standardisé ELISA pour le dépistage de la séroprévalence à LCMV chez l'Homme. La technique ELISA présente plusieurs avantages. Premièrement, elle ne nécessite pas d'immunofluorescence et supprime donc la subjectivité de la lecture du résultat. Deuxièmement, c'est une technique rapide, peu onéreuse et est réalisable dans un laboratoire médical. Troisièmement, la détection du signal permet une quantification de l'échantillon, information qui peut se révéler utile en clinique. Finalement, l'avantage majeur d'utiliser cette technique est qu'elle ne nécessite plus la manipulation du virus et est, de ce fait, beaucoup plus sûre biologiquement. Son champ d'application en devient donc plus large car le matériel de laboratoire nécessaire est moindre et son coût restreint en ferait un test envisageable pour le dépistage et le diagnostic d'une infection à LCMV.

Objectif 1: Evaluation de l'antigénicité des antigènes viraux produits par différents systèmes

Lors de l'infection à LCMV, les anticorps développés précocement sont ciblés contre la protéine NP. Les anticorps spécifiques à GP, quant à eux, semblent apparaître plus tardivement et à des titres inférieurs. Les différents types d'ELISA mis au point, à ce jour, pour étudier la liaison des anticorps anti-LCMV (IgG) utilisent, comme antigène, le virus LCMV purifié, inactivé par irradiation aux UVs et immobilisé dans des plaques à microtitre (Kunz et al., 2004). Ces protocoles ont l'avantage d'utiliser l'antigène viral natif. Le désavantage est que sa production nécessite beaucoup de ressources en termes d'argent et d'infrastructures. Pour tenter d'améliorer le protocole, nous allons donc évaluer deux différentes LCMV NP recombinantes. La première est produite par un système d'expression bactérien quant à la deuxième, elle est produite à l'aide d'un vecteur baculovirus dans des cellules d'insecte. Une première étape du projet sera donc d'évaluer l'antigénicité des LCMV NP recombinantes par rapport au virus purifié.

Objectif 2: Développement d'un test ELISA pour LCMV utilisant des sérums d'animaux certifiés

Notre deuxième objectif est de développer et d'optimiser un test ELISA indirect pour LCMV en utilisant initialement comme anticorps primaire des IgG provenant de sérums de cochon d'Inde certifiés préalablement infectés par LCMV. Le but de ce travail est de déterminer la performance du test.

Objectif 3: Adaptation du protocole à des sérums humains

Le test va, par la suite, être adapté aux échantillons de sérums humains. Des échantillons contrôles positifs ont été obtenus auprès de Scripps Research Institute, La Jolla, USA.

Objectif 4: Comparaison de la sensibilité de l'ELISA LCMV par rapport à une IFA conventionnelle

A cette étape du travail, nous allons comparer la sensibilité ainsi que la spécificité du test ELISA que nous avons développé avec celles de la méthode IFA conventionnelle (gold standard). L'objectif recherché, ici, étant de définir la performance de notre test ELISA relativement à une IFA puis d'optimiser notre protocole afin d'obtenir des valeurs de sensibilité et de spécificité égales voire supérieures à une IFA.

Objectif 5: Mesure de la spécificité du test

L'objectif final est d'établir, à l'aide de la fonction ROC (Receiver Operating Characteristic), la spécificité et la performance de notre test.

3 RÉSULTATS

3.1 Production des antigènes

En 2004, un premier test ELISA a été développé dans notre groupe de travail utilisant le virus LCMV purifié comme antigène (Kunz et al., 2004). A la suite, ce test a été utilisé avec succès dans plusieurs études expérimentales chez la souris. Le but de mon étude est de développer un test de sérologie LCMV humain applicable dans la routine du diagnostic hospitalier. Le point faible du test existant étant l'utilisation du virus purifié comme antigène, nous avons donc remplacé ce dernier par une protéine LCMV NP recombinante. Il n'est en effet pas envisageable, de façon routinière, d'utiliser un virus natif inactivé en technique de dépistage pour plusieurs raisons. D'une part, la production de virus pour un éventuel dépistage en dehors d'une zone endémique pose des difficultés en termes de disponibilité de souches virales à cultiver. Une solution serait l'envoi de virus mais cela est souvent problématique pour des raisons de biosécurité. D'autre part, la production, la purification puis l'inactivation du virus sont des procédés qui nécessitent beaucoup de ressources matérielles, d'infrastructures spécifiques ainsi que du personnel spécialement formé.

Comme expliqué au sous-chapitre Structure et génome, la NP est la protéine la plus abondante dans le virus et, de surcroît, les premiers anticorps produits spécifiquement lors d'infection à LCMV sont ciblés contre la NP. Ce sont les deux raisons pour lesquelles nous avons choisi la NP comme antigène. Comme les premiers anticorps sont ciblés contre la NP, le diagnostic d'une infection peut être posé plus tôt au cours de cette dernière et ainsi offrir un meilleur pronostic au patient grâce à une administration plus rapide et plus ciblée du traitement.

Basé sur le test déjà existant, nous avons défini l'antigénicité du virus LCMV Arm 53b en tant qu'antigène viral standard. Dans une première étape, on a donc commencé à produire LCMV Arm 53b dans des cellules BHK21 comme expliqué dans la section Matériels et Méthodes. Suite à la production en grande quantité du virus, nous avons besoin de connaître son titre et, pour des raisons de sécurité, d'être sûrs de son inactivation totale. Etant donné les 2 types de purification faites, nous avons calculé le titre et vérifié l'inactivation pour chaque méthode. Nous avons obtenu les titres suivants : pour LCMV Arm 53b purifié par la méthode PEG : 2.3×10^9 PFU/ml et pour LCMV Arm 53b purifié via un gradient Renografin : 1.75×10^8 PFU/ml. Pour LCMV Arm 53b purifié par PEG, l'inactivation n'a pas été complète, et ce peut-être en raison de la grande quantité d'albumine présente dans l'échantillon. L'albumine a en effet la capacité d'absorber le rayonnement UV et a, de ce fait, protégé le virus, le laissant actif. Une deuxième exposition de 15min aux UVs a été effectuée pour atteindre une inactivation complète.

Comme antigène recombinant, nous avons utilisé deux formes de LCMV NP recombinantes. Utilisant un système bactérien basé sur *E.coli*, Madame Ana Rita Gonçalves, collaboratrice de notre laboratoire, a produit une forme recombinante de LCMV NP. La deuxième forme recombinante de LCMV NP a été produite dans des cellules d'insecte par notre collègue, le Dr. Shigeru Morikawa (Center of Emerging Infectious Diseases, Japan) comme décrit (Takimoto et al., 2008). Pour montrer la présence de LCMV NP dans nos échantillons et afin d'évaluer son intégrité ainsi que sa pureté, nous avons effectué une analyse utilisant l'électrophorèse SDS (SDS-PAGE) suivi d'une coloration au Coomassie Brilliant Blue pour détecter la protéine. Afin de détecter spécifiquement la présence de la LCMV NP, nous avons analysé les mêmes échantillons par Western-blot. Un sérum de cochon d'Inde certifié, spécifique à LCMV, a été utilisé comme anticorps primaire. La figure 3A montre que la

méthode de purification LCMV avec le gradient de Renografin est très efficace. La NP produite dans le système cellule insecte est présente sous forme complète (60 kDa) avec la présence de plusieurs bandes spécifiques qui représentent des produits de dégradation. Cependant, comme le montre les deux techniques, la protéine bactérienne n'était pas détectée (Fig. 3A). Après vérification, nous avons remarqué que, suite à une erreur, les aliquotes chargées dans les puits 3, 4, 5 ne contenaient effectivement pas de NP recombinante. Nous avons évidemment effectué l'expérience une seconde fois avec les aliquotes contenant cette fois la NP bactérienne (Fig. 3B). Comme le montre cette seconde expérience, la NP produite dans le système bactérien est présente sous forme complète (60 kDa) mais il y a aussi présence de plusieurs produits de dégradation de la NP d'environ 45 kDa ainsi que des bandes majeures à environ 35 kD chacune (Fig. 3B).

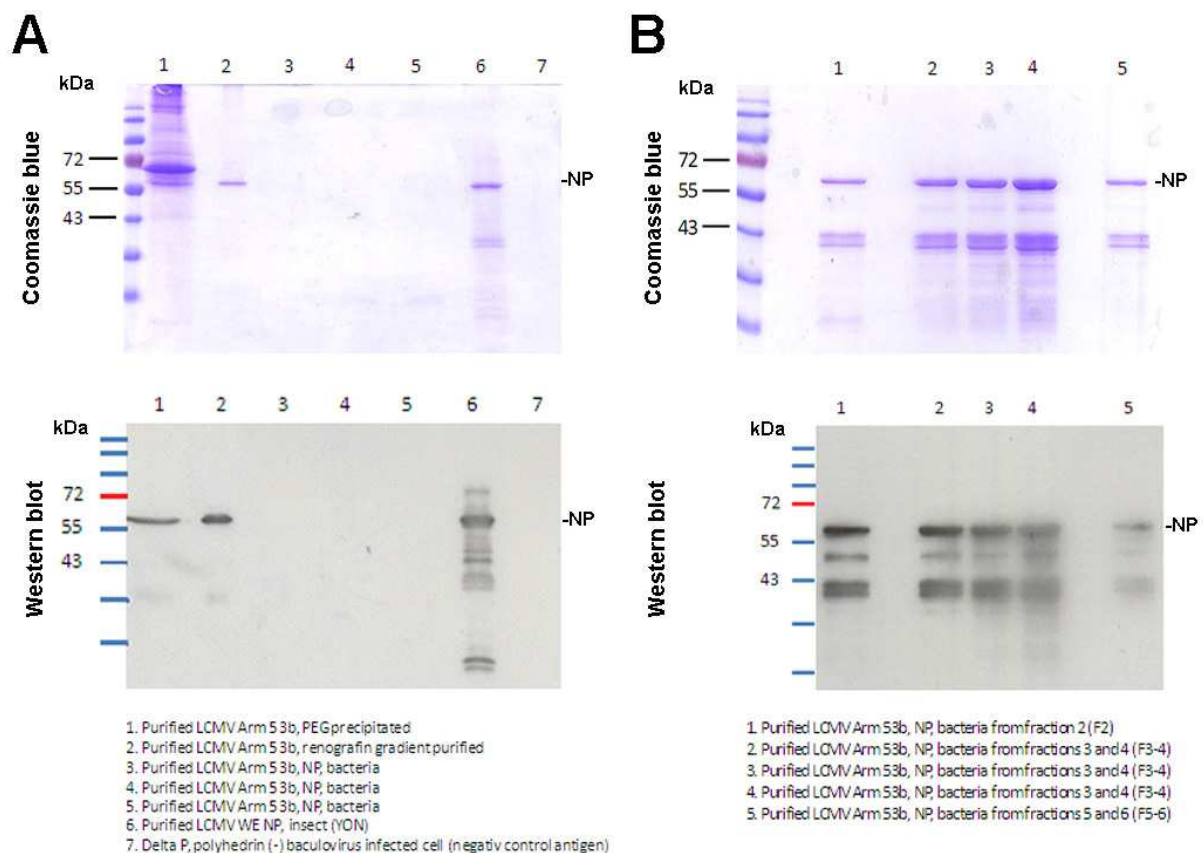


Figure 3 : LCMV NP recombinant. (A) Mise en évidence par Coomassie Blue et Western-blot de la NP produite dans les systèmes baculovirus et bactériens ainsi que des différents produits obtenus par les 2 deux techniques de purification de LCMV. Les puits 3 à 5 sont vides suite à une erreur de manipulation des échantillons de NP produites grâce au système bactérien. L'expérience a été reconduite pour corriger l'erreur (voir B). On voit dans les puits 1,2,6 la présence de la NP (60 kDa) mais aussi la présence de plusieurs produits de dégradation de la NP (35 et 45 kDa) **(B)** Mise en évidence par Coomassie Blue et Western-blot de la NP produite par le système bactérien. Présence dans tous les échantillons de la NP (60 kDa) ainsi que des produits de dégradation de cette dernière (35 et 45 kDa). Grâce à ces expériences, nous pouvons donc affirmer que chaque échantillon contient de la NP sous forme complète (60kDa).

3.2 Optimisation du coating des différentes NP recombinantes

Par la suite, nous avons optimisé le coating des NP recombinantes afin d'économiser nos antigènes. Nous avons effectué un coating à des concentrations différentes (10 dilutions d'un facteur 2 pour

chaque antigène). Pour la détection de l'antigène immobilisé, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal (mAb) 113 contre la LCMV NP (Kunz et al., 2004) en combinaison avec un anticorps secondaire lié à la peroxydase comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. L'idée étant de mesurer le point d'inflexion de la réaction. La concentration au point d'inflexion est la concentration qui nous permet d'avoir une sensibilité maximum de l'ELISA tout en économisant nos antigènes recombinants pour le coating. Comme on le voit sur la courbe pour la NP produite dans des cellules d'insecte, nous n'atteignons pas, comme attendu, un plateau qui signifierait la saturation de la réaction (Fig. 4). Cette droite ascendante dans les fortes concentrations vient du fait que la NP est capable de polymériser (Ortiz-Riano et al., 2012). La polymérisation de cette dernière au fond du puits offre un nombre de site de liaison pour mAb 113 supérieur à un coating complet ce qui explique l'augmentation linéaire de signal à forte concentration.

Les faibles signaux obtenus pour la NP produite dans le système bactérien nous montrent que nous avons probablement perdu un site d'antigénicité de mAb 113 lors de la production de NP dans le système bactérien. Ceci suggère qu'il manque, à la protéine NP produite dans *E. coli*, des structures essentielles à l'attachement de mAb 113. La nature de ces structures n'est pas connue mais il pourrait s'agir d'une modification post-translationnelle spécifique car nous n'observons pas ce phénomène pour la NP produite dans des cellules eucaryotes comme les insectes et les mammifères (BHK21). Comme le montre la figure 4, jusqu'à la dilution 1:80, nous avons une perte de la linéarité (doublement de la valeur mesurée) entre 2 dilutions successives ce qui indique un début de saturation du système. Nous avons donc choisi la dilution 1:80 comme concentration pour le coating.

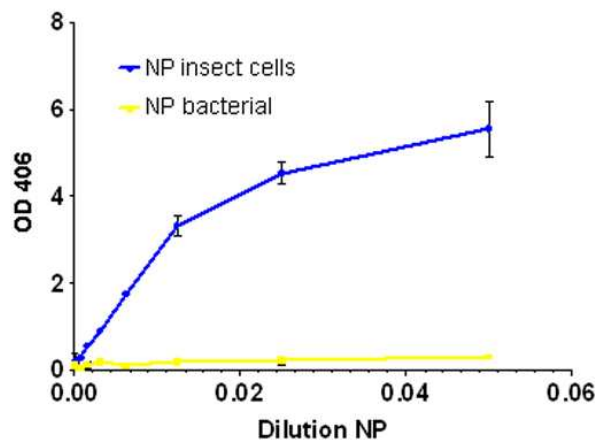


Figure 4 : Optimisation du coating. LCMV NP recombinante produite dans le système bactérien (NP bacteria) et insecte (NP insect cells) était immobilisée dans les plaques M96 aux concentrations indiquées ($\mu\text{g/ml}$). Détection de la NP immobilisée avec l'anticorps mAb 113 spécifique à LCMV NP en combinaison avec un anticorps secondaire lié à la peroxydase. Toutes les barres d'erreurs présentes dans ce rapport correspondent à un écart-type ($n = 3$).

3.3 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant un anticorps monoclonal

Pour comparer l'antigénicité de nos différentes NP, nous avons choisi d'utiliser l'anticorps monoclonal LCMV NP 113 comme anticorps primaire. Notre choix s'est porté sur cet anticorps de référence utilisé pour la reconnaissance de LCMV NP et qui, pour cette raison, avait déjà été utilisé dans le test ELISA préexistant (Kunz et al., 2004). Cette expérience nous permettra de mesurer l'antigénicité relative des NP recombinantes face à la forme présente dans le virus purifié (LCMV Arm 53b).

Comme attendu, suite aux résultats de l'expérience précédente, les données montrées dans la figure 5 nous indiquent une faible antigénicité de la NP produite dans le système bactérien. En revanche, la NP du système insecte montre une antigénicité plus élevée que LCMV Arm 53b purifié.

Ces résultats signifient que l'utilisation d'une NP recombinante avec une antigénicité supérieure à celle du virus LCMV purifié nous permettrait d'avoir un test diagnostique avec une plus grande sensibilité tout en ne nécessitant pas la manipulation du virus. Mais cette expérience ne suffit pas à pouvoir décider de l'antigène car par définition, un anticorps monoclonal ne réagit qu'à un seul épitope contrairement à la réaction immunitaire d'un être vivant. Nous devons donc maintenant réitérer cette expérience, en utilisant comme anticorps primaire, des sérums certifiés immunisés et non-immunisés (contrôle négatif) à LCMV et non plus un anticorps monoclonal.

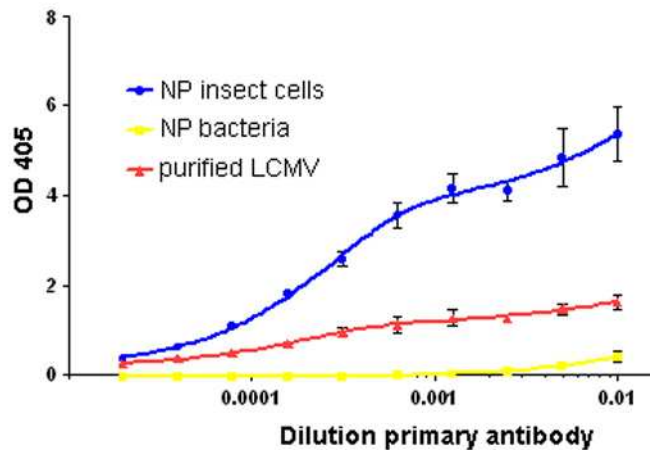


Figure 5 : Comparaison de l'antigénicité des LCMV NP recombinantes avec celle du virus. LCMV NP recombinantes produites dans le système bactérien (NP bacteria) et insecte (NP insect cells), ainsi que le virus purifié (purified virus) étaient immobilisés dans les plaques M96. La détection de l'antigène immobilisé a été effectuée comme décrit dans la figure 4 utilisant les dilutions de mAb 113 indiquées. Nous observons une forte perte de l'antigénicité de la LCMV NP bactérienne relativement au virus. En revanche, un signal plus fort est détecté pour la NP insecte par rapport à celle du virus.

3.4 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes en utilisant des sérums certifiés

Suite aux résultats de l'expérience précédente, nous avons utilisé des sérums de cochon d'Inde certifiés comme anticorps primaires en lieu et place de LCMV NP mAb 113 afin d'avoir une expérience plus proche de la réalité clinique. Le but étant de confirmer la tendance de gain de signal de LCMV NP produite dans des cellules d'insecte observé précédemment et d'ainsi éventuellement éliminer LCMV NP bactérien comme antigène de remplacement à LCMV Arm 53b.

Comme nous le montrent les données de la figure 6, aucun sérum contrôle négatif n'a réagi de manière significative aux antigènes ce qui élimine un effet de cross-réaction entre les anticorps primaires (d'un individu quelconque) et les antigènes testés. Ceci est capital car une importante cross-réaction nous obligerait à éliminer l'antigène en question parce qu'elle diminuerait la spécificité du test. Les sérums anti-LCMV ont tous réagi et ce, de manière semblable aux expériences précédentes. Ceci nous permet donc d'écartier définitivement la NP bactérienne des antigènes potentiels. De plus, une préparation de protéines à partir de cellules d'insecte non-transfectées (DeltaP) a été introduite comme contrôle négatif. L'expérience nous confirme une nouvelle fois l'antigénicité supérieure de NP insecte par rapport à LCMV Arm 53b. Sur la base de ces résultats, la NP insecte est donc choisie comme antigène de remplacement à LCMV Arm 53b pour le développement de notre test ELISA. Aux vues des densités optiques (OD) obtenues, nous décidons de diluer davantage le sérum cochon d'Inde pour les expériences suivantes afin d'avoir des OD avoisinant 2 (les signaux inférieurs à 1% ne sont plus significatifs pour le spectrophotomètre utilisé).

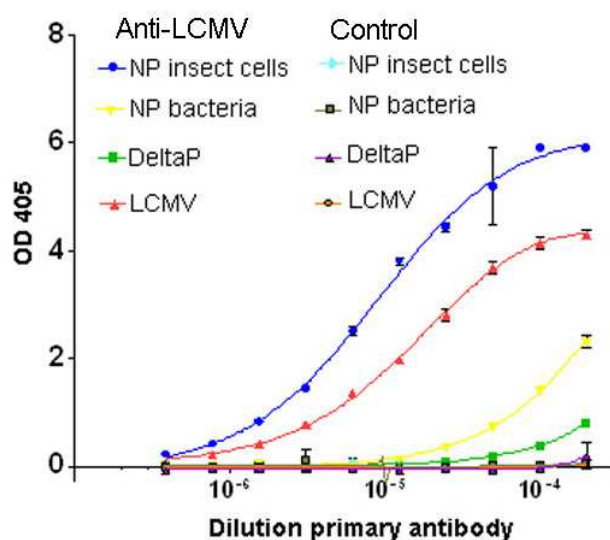


Figure 6 : Comparaison de l'antigénicité des LCMV NP recombinants avec le virus utilisant un sérum certifié. LCMV NP recombinante du système bactérien (NP bacteria), insecte (NP insect cells), ainsi que le virus purifié (LCMV) et une préparation de protéines d'insecte de cellules non-transfectées (DeltaP) étaient immobilisés dans les plaques M96. Détection de la NP immobilisée avec un sérum anti-LCMV (Anti-LCMV) et un sérum contrôle (Control) en combinaison avec un anticorps secondaire lié à la peroxydase. Aucune cross-réaction n'est observée entre les sérums contrôles et les différents antigènes.

3.5 Comparaison de la sensibilité par technique ELISA versus technique IFA

Afin de mesurer la sensibilité de chaque méthode, nous avons effectué, en parallèle, une IFA et un ELISA. Pour ces deux expériences, nous avons utilisé les mêmes sérums certifiés ainsi que les mêmes anticorps secondaires. L'unique différence étant le système de détection qui permet la révélation en se liant aux anticorps secondaires. Pour l'ELISA, nous avons utilisé la streptavidine-HRP et pour l'IFA, nous avons pris la streptavidine-Alexa 594. Pour la technique ELISA, nous avons utilisé la fonction Two-way ANOVA pour déterminer si le signal mesuré pour NP ou LCMV purifié est supérieur au bruit de fond obtenu avec le contrôle négatif (DeltaP).

Dans notre test ELISA, à la 5^{ème} dilution, le signal était encore significatif à ($P < 0,0001$) pour nos 2 antigènes, ce qui donne un titre ELISA de 1/1'280'000 (figure 7). Selon le test IFA nous avons considéré la 5^{ème} dilution comme significativement positive donnant un titre IFA de 1/16'000. Grâce à cette expérience, nous avons pu constater que la technique ELISA fournit une sensibilité 80 fois supérieure à celle de l'IFA.

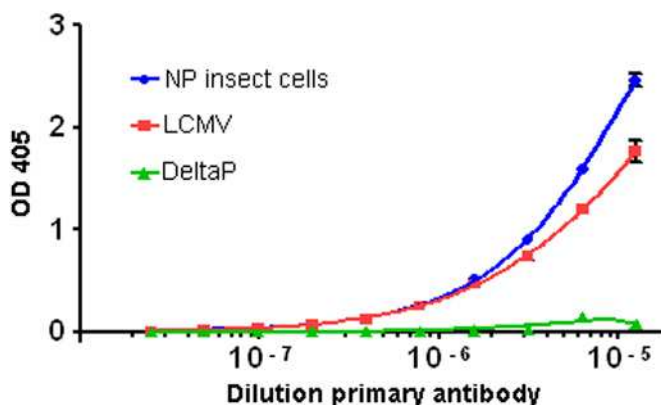


Figure 7 : Détermination du titre ELISA avec un sérum certifié. La détection des antigènes indiqués a été effectuée comme décrit en figure 6. Le graphique illustre le signal obtenu en fonction des différents titres de l'anticorps primaire. La fonction Two-way ANOVA nous a permis de déterminer que l'amplitude du signal à la 5^{ème} dilution (1/1'280'000) est encore significative par rapport au signal contrôle (DeltaP).

3.6 Comparaison de titres ELISA mesurés entre système « avec » et système « sans » amplification

Dans la prochaine expérience, nous avons comparé le gain de signal donné entre un système d'amplification (anti IgG biotinylée/streptavidine-HRP) et un système « classique » (anti IgG HRP). L'avantage de la méthode « classique » est sa rapidité de réalisation car moins d'étapes sont nécessaires. Son désavantage est qu'elle offre une moins grande amplification du signal ce qui peut le rendre plus difficile à identifier face au bruit de fond.

La comparaison des deux techniques, illustrées dans la figure 8, nous confirme un signal plus faible par technique « classique ». Par cette dernière, nous avons donc un gain de temps et d'argent mais une perte de sensibilité. Le test ELISA avec le système d'amplification représente donc une méthode prometteuse pour la détection des anticorps anti-LCMV dans des échantillons dont le titre d'anticorps (IgG) sera faible (p.ex. des échantillons provenant de cas pédiatriques).

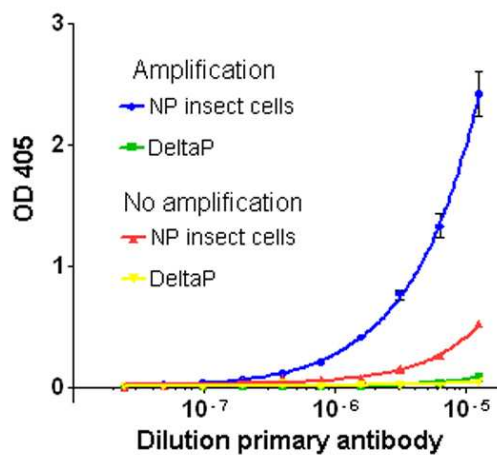


Figure 8: Comparaison du test ELISA avec ou sans amplification. LCMV NP recombinante produite dans le système insecte (NP insect cells) et le contrôle (DeltaP) étaient immobilisés dans les plaques M96. Détection de la NP immobilisée avec le sérum anti-LCMV par ELISA classique versus ELISA avec système d'amplification.

3.7 Contrôle qualité de la 2^{ème} extraction de NP et contrôle DeltaP

Suite aux expériences précédentes, nous n'avions plus assez d'antigène pour continuer la suite des expériences. Nous avons donc fait une seconde extraction de NP et DeltaP à partir du matériel livré par le laboratoire du Dr. Shigeru Morikawa, Tokyo, Japon. Afin de s'assurer de la qualité de cette seconde extraction, nous avons effectué un contrôle qualité. Pour s'assurer du maintien de l'antigénicité, nous avons fait un test ELISA comparatif entre les aliquotes NP et DeltaP de la 1^{ère} versus de la 2^{ème} extraction (figure 9A). Pour ce faire, nous avons utilisé des sérums de cochons d'Inde certifiés comme anticorps primaires. En parallèle, nous avons aussi effectué une coloration Coomassie Blue (figure 9B). Ces deux techniques nous ont permis de vérifier la qualité des protéines NP et DeltaP lors de la 2^{ème} extraction.

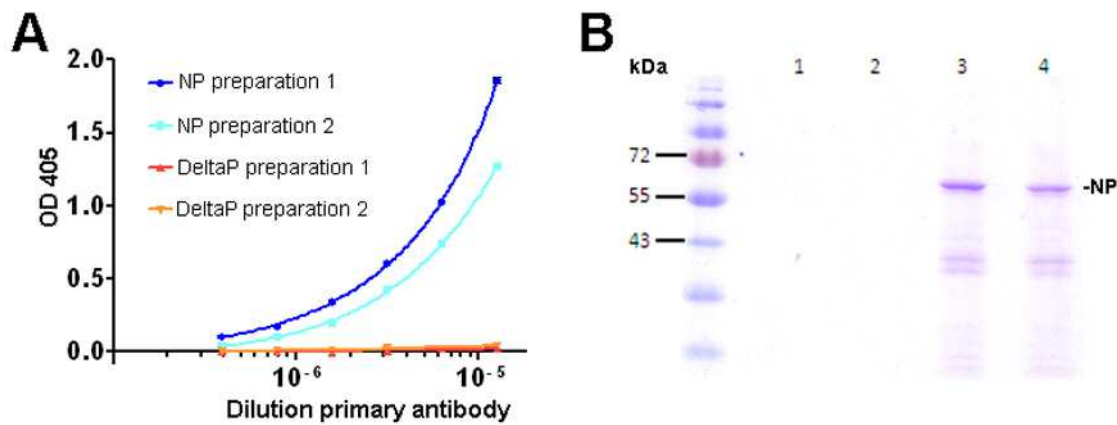


Figure 9 : Contrôle qualité de la 2^{ème} extraction de NP et contrôle DeltaP. (A) Détection de la NP immobilisée avec le sérum anti-LCMV par ELISA classique. **(B)** Mise en évidence par Coomassie Blue de la NP 1^{ère} extraction (puits 3) versus 2^{ème} extraction (puits 4) et de son absence dans les DeltaP 1^{ère} extraction (puits 1) et 2^{ème} extraction (puits 2).

3.8 Adaptation du test ELISA au sérum humain

A cette étape, nous avons adapté notre test ELISA, établi pour le sérum de référence cochon d'Inde, au système humain. Pour ce faire, nous avons utilisé le même protocole que l'expérience ci-dessus à une exception près. Comme les sérums de patients sont des sérums collectés suite à une primo-infection et non pas suite à une réponse boostée, comme ceux de cochon d'Inde, nous nous attendons à un signal moins intense. Les sérums ont donc été moins dilués afin d'avoir une intensité de signal supérieure. Nous nous attendons ainsi à une augmentation du signal background, en comparaison de celui obtenu pour le cochon d'Inde. Cette augmentation est liée au nombre supérieur d'antigènes rencontrés durant la vie de nos patients (durée de vie supérieure, vie dans un milieu non cloîtré (laboratoire)). Cette «expérience immunogénique» a une forte probabilité d'augmenter le signal background dû à une potentielle cross-réaction entre une IgG spécifique à un antigène rencontré par le passé et notre antigène utilisé dans le test. Pour toutes les expériences avec des sérums humains, nous avons utilisé un anticorps secondaire anti-humain IgG. Etant donné qu'une des populations d'intérêt est le nouveau-né, notre test doit correspondre aux caractéristiques spécifiques de cet âge. Il faut savoir que le nouveau-né ne possède pas encore un système immunitaire fonctionnel. C'est pourquoi, afin de protéger l'enfant durant cette période de « pseudo-immunodéficience » ou « d'immuno-inexpérience », seules des immunoglobulines du sous-type G, provenant du sang maternel, peuvent traverser la barrière placentaire et ainsi protéger le fœtus/embryon. Au moment de sa naissance, le nouveau-né possède donc uniquement un stock d'anticorps de type IgG maternels et cela à un titre inférieur à celui de sa mère (adulte immunocompétente). Au cours des premiers mois de vie de l'enfant, les IgG maternels vont diminuer pour disparaître vers l'âge de 6 mois. En parallèle, l'enfant va débiter sa propre production d'IgM puis d'IgG. Tenant compte de cette spécificité, notre test est développé en utilisant des anticorps secondaires anti-humain IgG uniquement, même si cela engendrera une faible perte du signal mesuré chez un adulte immunocompétent (perte du signal provenant des IgM, IgA (frottis nasaux, buccaux), IgD). Dans une première série de tests, nous avons observé une augmentation du signal background non négligeable (données pas présentées). Etant donné que cette situation va augmenter la

proportion de faux positifs (et donc diminuer la valeur prédictive du test), nous avons minimisé ce signal non-spécifique, afin d'éviter de diminuer la spécificité du test.

L'objectif de cette nouvelle expérience a été de minimiser le bruit de fond. Cela permettrait d'augmenter au maximum le delta amplitude entre la courbe du signal de réponse pour l'antigène NP par rapport à l'antigène contrôle négatif (DeltaP). Une amplitude maximale nous offrirait la possibilité de discriminer au mieux les patients positifs ainsi que de mieux caractériser les sérums avec faible titre d'IgG du signal background. Pour y parvenir, nous avons ajouté du détergent (Tween-20) aux solutions de lavage ainsi que dans le milieu de dilution de l'anticorps primaire (sérum du patient). Le Tween-20 est un détergent qui assure un lavage plus efficace ayant l'effet de minimiser le bruit de fond non-spécifique. Nous avons aussi intégré, cette fois, le sérum d'une patiente enceinte. Nous l'avons écarté lors de la première expérience sur le motif que la grossesse induit un état immunitaire transitoire particulier. Comme nous cherchions à mesurer l'antigénicité des différents antigènes, nous avons écarté la patiente présentant un statut immunitaire « non-standard » qui aurait pu amener des confusions et ainsi modifier notre évaluation de l'antigénicité. Evidemment, elle fut réintégrée pour cette expérience car elle représente une des populations cibles. Comme visible sur les graphiques de la figure 10, notre protocole a permis d'obtenir les résultats escomptés. Nous pouvons maintenant mesurer un signal d'un ordre de grandeur 10 fois supérieur au signal bruit de fond pour les patients séropositifs.

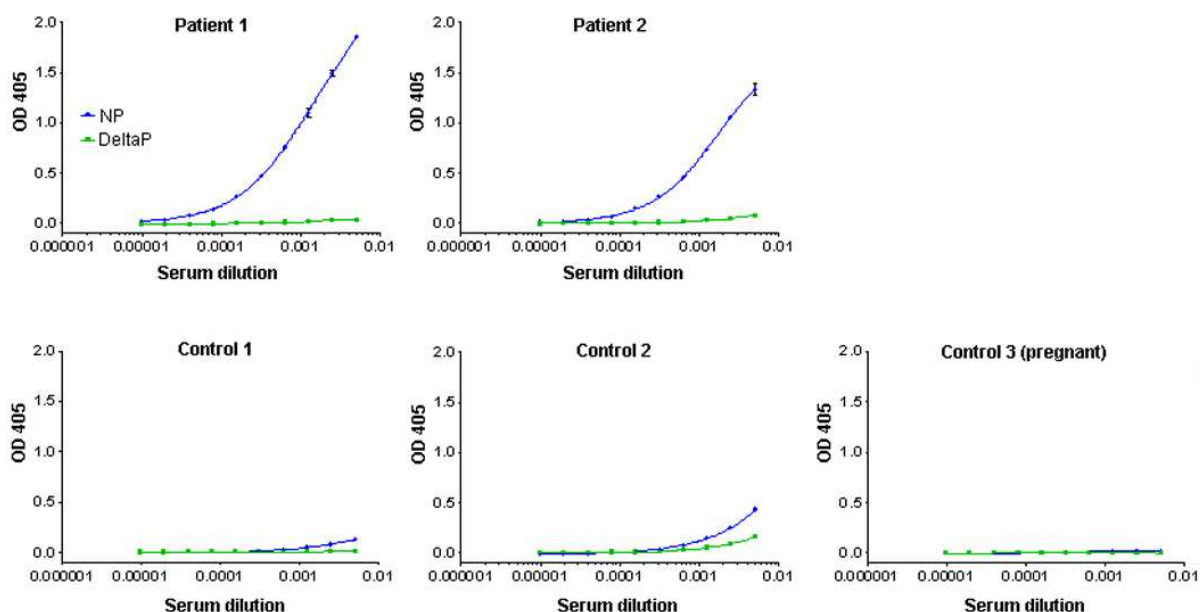


Figure 10 : Détection des anticorps IgG anti-LCMV dans des échantillons sérum patients. LCMV NP recombinante produite dans le système insecte (NP) et le contrôle (DeltaP) sont immobilisés dans les plaques M96. Détection de la NP immobilisée avec les sérums de deux patients infectés avec LCMV (Patient 1 et 2), deux sérums d'individus non-infectés (Control 1 et 2) et d'une femme enceinte (Control 3) par ELISA classique utilisant un anticorps secondaire anti-IgG.

3.9 Test de spécificité de notre ELISA

Pour tester la caractéristique de fonctionnement de notre test ELISA chez l'Homme, nous avons conduit une analyse de sa spécificité utilisant le concept du *Receiver Operating Characteristic* (ROC).

La courbe ROC est une mesure de la performance d'un test qui a pour but de catégoriser des échantillons testés en deux groupes distincts, dans notre cas, séropositif ou séronégatif. Suite à l'analyse ROC, la performance du test est représentée sous la forme d'une « courbe ROC » qui donne le taux d'analyses correctes dans un groupe (taux de vrais positifs) en fonction du nombre de classifications incorrectes (taux de faux positifs) pour ce même groupe. Maintenant que les différents paramètres du test ont été optimisés, nous pouvons conduire l'expérience finale qui va nous permettre de calculer la sensibilité et la spécificité propres à notre test. Nous avons testé « en aveugle » les 25 sérums disponibles. Tous les sérums ont été préalablement testés par IFA ainsi que par Western-blot afin de s'assurer de leur séropositivité ou respectivement de leur séronégativité ; les deux tests devant indiquer le même résultat. Etant donné que nous n'avions pas en notre possession des sérums provenant de nouveau-nés infectés, 5 sérums bébés ont été « fabriqués ». Ces sérums ont été obtenus après dilution des différents sérums disponibles. Au final, ces manipulations permettent de mimer un sérum bébé. La principale difficulté avec ce genre de sérum (faible titre d'IgG) est de pouvoir les discriminer par rapport au signal d'un patient séronégatif car ils donneront un signal inférieur en comparaison de sérums de patients adultes immunocompétents.

Nous avons décidé de tester deux différentes dilutions de sérums pour permettre d'optimiser la sensibilité au risque d'avoir des faux positifs et aussi, d'optimiser la spécificité pour éviter tout faux négatifs. La dilution 1 : 200 vise à optimiser la sensibilité. Comme illustré par le graphique de la patiente contrôle 2 de la figure 10, une optimisation de la sensibilité (correspondant à un abaissement du seuil de décision pour un signal) permettrait de détecter des sérums à faible taux d'IgG. Cependant de faux positifs pourraient être engendrés (comme pour le cas de la patiente qui possède un fort signal non-spécifique). Dans une logique de dépistage à large échelle, le fait d'avoir des faux positifs n'est pas forcément mauvais car nous sommes ainsi assurés de détecter tous les individus séropositifs. Un second test (souvent plus onéreux ou nécessitant plus de ressource) est appliqué chez les patients ayant un test positif, afin d'écarter les faux positifs du premier test et ainsi leur éviter un traitement inutile pouvant affecter leur santé. La dilution 1 : 1000 permet d'optimiser la spécificité, critère important en diagnostic car permettant d'écarter une piste et de se focaliser sur d'autres causes expliquant la symptomatologie. La dilution 1 : 1000 a l'avantage d'avoir une amplitude de signal moins grande permettant de diminuer celle des signaux non-spécifiques. Grâce à cela, une meilleure détection de fortes amplitudes de signaux correspondant à une séropositivité et donc à une meilleure valeur prédictive du test est assurée. Le test optimal étant celui qui possède une sensibilité et une spécificité de 100%. Comme l'illustre la figure 11, la courbe ROC calculée nous montre des résultats très satisfaisants. Ces valeurs calculées sont à relativiser car la taille de la population testée ne représente que 25 individus. Cependant, la sensibilité et la spécificité obtenues sont très encourageantes pour réitérer l'expérience sur une population plus grande afin d'affiner ces valeurs.

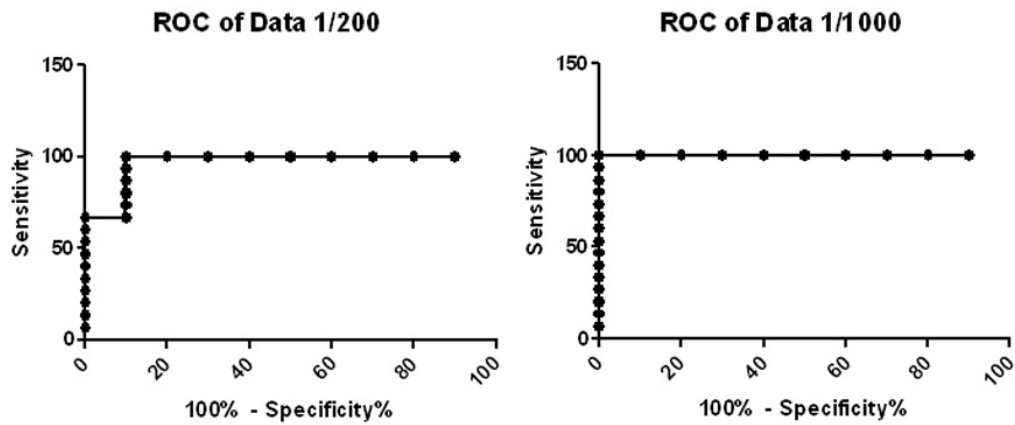


Figure 11 : Graphique des courbes ROC obtenues pour notre test ELISA. La dilution 1 : 200 (optimisation de la sensibilité) nous montre une spécificité réduite. En revanche, la dilution 1 : 1000 (optimisation de la spécificité) nous montre une sensibilité ainsi qu'une spécificité de 100%.

4 DISCUSSION

Le but de notre projet était de développer un test sérologique ELISA standardisé pour le dépistage et le diagnostic de la séroprévalence de LCMV chez l'Homme. La NP virale étant la première et la plus abondante protéine virale exprimée lors de l'infection à LCMV, nous avons choisi la NP comme antigène pour notre test ELISA. Etant donné que les premiers anticorps produits par l'hôte lors d'une infection sont ciblés contre la NP, ceci appuie encore plus notre choix. Les différents types d'ELISA mis au point à ce jour utilisent, comme antigène, le virus LCMV purifié et inactivé par irradiation aux UVs (Kunz et al., 2004). Le désavantage de ce genre de protocole est la production du virus nécessitant beaucoup de ressources. Pour éviter cette production virale, nous avons évalué deux différentes LCMV NP recombinantes : L'une a été produite par un système d'expression bactérien et l'autre utilisant un système de cellules insecte (eucaryotes) utilisant un vecteur baculovirus. Dans une première étape, nous avons évalué l'antigénicité des LCMV NP recombinantes par rapport au virus LCMV Arm 53b purifié. Utilisant mAb 113 spécifique pour LCMV NP, nous avons détecté une très faible réaction avec la NP provenant de la source bactérienne mais une forte détection de la protéine produite dans les cellules insecte. Nous expliquons cette faible amplitude de signal par une perte du site d'antigénicité de la protéine reconnue par mAb 113 (épitope). Etant donné que la séquence protéique n'a pas été modifiée, seule une modification post-translationnelle comme par exemple une phosphorylation au niveau de l'épitope spécifique à mAb 113 expliquerait cette diminution de signal. Nous supposons donc que le système bactérien ne permet pas l'ajout de modification post-translationnelle appropriée. Il serait fort intéressant de caractériser précisément cet épitope afin de s'assurer de la bonne adéquation de l'utilisation de mAb 113 comme anticorps de référence. Cette question n'a pas été investiguée car elle dépasse le cadre de ce travail de Master.

Etant donné que le signal produit par la NP provenant des cellules insecte était supérieur à LCMV purifié pour tous les sérums testés (souris, cochon d'Inde, Homme), nous avons donc choisi cette dernière comme antigène pour le test. Ce choix représente un avantage considérable. En effet, l'utilisation de la NP recombinante ne nécessite ni la production de virus ni l'inactivation de ce dernier. Cela est donc sûr pour le personnel de laboratoire ou celui effectuant le test car NP ne peut, d'aucune manière, transmettre la maladie liée à LCMV. De plus, sa production nécessite moins de moyens et moins de ressources financières. Un autre avantage est qu'elle fonctionne pour toutes les espèces animales testées (souris, cochon d'Inde, Homme). Il est donc facile, à partir de ce test, de développer la version spécifique à chacune de ces espèces. Ceci permettrait de réaliser les études mesurant la séroprévalence de LCMV chez ces animaux et si la situation sanitaire se péjorait, d'être capable de prendre les mesures adaptées envers l'espèce responsable de toute propagation de la maladie, y compris certaines espèces d'animaux de compagnie tel que le hamster, comme c'était le cas lors de la transmission de LCMV aux patients transplantés (Fischer et al., 2006; Palacios et al., 2008).

Malgré la sensibilité déjà assez élevée de notre test ELISA, nous avons évalué la possibilité d'augmenter celle-ci par un système d'amplification utilisant un anticorps secondaire biotinylé reconnu par la streptavidine-HRP. Contrairement à ce qui est observé dans d'autres systèmes, ce type d'amplification n'augmente pas la sensibilité du test par rapport à une technique ELISA simple. Dans une perspective de dépistage à large échelle, un test simple est particulièrement intéressant car le coût de chaque test sera réduit, étant donné que le temps d'utilisation des machines, du personnel et le besoin en matières premières sont minimisés.

L'avantage particulier de notre test ELISA pour LCMV est sa capacité de détecter de faible titre d'IgG. En effet, comme mesuré avec les sérums de référence, la sensibilité par ELISA est environ 80 fois supérieure à l'IFA qui est, à l'heure actuelle, le « gold standard » en termes de diagnostic de séropositivité à LCMV. Ce gain de sensibilité se traduit, en clinique, par la capacité de détecter une séropositivité plus rapidement dans le cours de la maladie qu'actuellement avec la technique IFA. Cela représente un enjeu important, car le traitement d'une infection à Arénavirus par la ribavirine doit débiter dans la première semaine suivant l'infection, si on veut pouvoir modifier le cours de la maladie (McCormick et al., 1986; Parker, 2005). Plus l'intervention est précoce, meilleur en sera le pronostic (McCormick et al., 1986). Ce test élargit donc la fenêtre diagnostic, permettant ainsi une administration plus sûre de la ribavirine mais surtout améliorant le pronostic du patient par son administration plus précoce dans le développement de la maladie.

Un aspect important en dépistage est d'avoir un test ayant une sensibilité maximale car on aura ainsi une représentation plus exacte de la séoprévalance au sein d'une population. Un des problèmes donc, de l'IFA, est qu'il sous-estime la séoprévalance à LCMV dû à sa moindre sensibilité. Notre test permettrait ainsi d'avoir une représentation plus crédible concernant la séoprévalance de LCMV au sein de la population et cela, grâce à une sensibilité 80 fois supérieure à l'IFA. Il serait des plus intéressants de mener une étude à large échelle visant à déterminer la séoprévalance à LCMV dans la population au moyen de notre test ELISA. Les résultats pourraient mettre en évidence une sous-estimation de la séoprévalance à LCMV au sein de la population actuelle par l'identification d'individus ayant de faible titre d'anticorps spécifiques.

Comme mesuré à l'aide de la courbe ROC, la sensibilité ainsi que la spécificité de ce test sont très bonnes. Il serait cependant intéressant de connaître la valeur pré-test de la maladie afin de pouvoir calculer le nombre exact de patients potentiellement dépistés, versus le nombre de faux positifs, afin de calculer son utilité en dépistage dans la population générale et chez le nouveau-né. Cela permettrait aussi de mieux caractériser l'incidence ainsi que la prévalence de LCMV dans d'éventuels sous-groupes à risques (personnel d'animalerie, de laboratoire, forestier, éboueurs, vétérinaires, propriétaires de rongeurs,...).

5 MATÉRIELS ET MÉTHODES

5.1 Production et purification du virus

Premièrement, nous avons défini l'antigénicité du virus LCMV Arm 53b en tant qu'antigène viral standard. Nous avons commencé à produire LCMV Arm 53b dans des cellules BHK21 (cellules de hamster). Ces dernières ont été mises en culture dans 4 flasques T150. Après 24 heures, le milieu de culture (DMEM, 10% FCS) a été retiré. Les cellules BHK21 ont été infectées par une solution de LCMV Arm 53b mélangé à du milieu de culture afin d'obtenir une MOI (multiplicity of infection = quantité de particules virales infectieuses par cellules) de 0.01. 48h post-infection, le milieu conditionné a été récolté et nous avons procédé à la purification comme suit : Le milieu a été séparé en 2 aliquotes de 50ml chacun. Les 2 tubes ont été centrifugés à 500 g durant 10min pour sédimenter les éventuelles cellules mortes présentes dans le milieu. On a ajouté $\frac{1}{4}$ du volume (soit 12.5ml/tube) d'une solution de 35% (wt/vol) PEG 8000, 2M de NaCl pour obtenir une solution finale de 7% (wt/vol) PEG 8000, 0.4M NaCl dans chacun des tubes. Le tout a été laissé incubé 2h sur glace. Les 2 échantillons ont été ensuite centrifugés à 17'000 g durant 30min à une température de 4°C. Le surnageant a été retiré et le précipité a été resuspendu dans 1ml de PBS pour un tube ensuite stocké à -80°C (appelé par la suite LCMV Arm 53b PEG) et dans 6ml de tampon TNE (10mM Tris/HCL pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA) pour le second destiné à la purification. Un gradient discontinu de Renografin-76 a été produit comme suit et ajouté au tube : 1ml à 50%, 2ml à 40% et 3ml à 10%. 6ml de la solution contenant le virus ont ensuite été ajoutés. Le tube a été centrifugé durant 90min à 4°C à $\sim 210'000g$ avec un rotor TST 41.14. Ensuite, la bande blanche visible à l'interface des solutions de Renografin-76 à 10% et 40% ($V_{\text{final}} \sim 1ml$) a été prélevée. Ce volume a été, par la suite, dialysé une nuit entière dans du PBS avec une cassette ayant des pores de 300 kDa. Le virus dialysé a été récolté et stocké à -80°C dans 2 aliquotes. L'une de 50 μl utilisée pour le titrage du virus et l'autre de $\sim 950 \mu l$ (appelée LCMV Arm 53b Renografin) qui, avec LCMV Arm 53b PEG, sera inactivée par exposition aux UVs et sera utilisée pour le développement de l'ELISA.

5.2 Titrage du virus

La technique choisie pour le titrage du virus et la mise en évidence de son inactivation a été l'ImmunoFluorescence Assay (IFA). Cette dernière est une technique utilisant des anticorps spécifiques à la molécule recherchée et la révélation se fait par fluorescence grâce à un fluorochrome lié à l'anticorps primaire ou secondaire selon si l'IFA est directe ou indirecte. Cette technique permet de déterminer le nombre de cellules infectées par le virus.

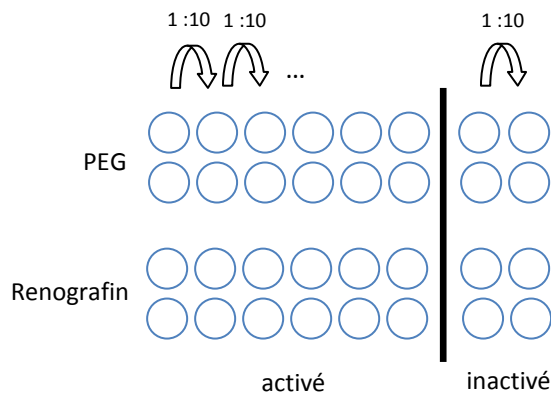


Figure 12 Schéma des séries de dilution

stock viral infectieux a été conservée. Le reste des stocks de LCMV Arm 53b Renografin et PEG a été inactivé par une exposition de 10min à la lampe UV. Avec les 2 stocks encore actifs, nous avons réalisé une dilution en série de 1 :10 sur 6 étapes. Pour les stocks inactivés, nous avons fait une seule dilution de 1 :10 puis les puits ont été infectés par 100 µl de la dilution correspondante. La plaque a été déposée 1h dans l'incubateur à 37°C. Suite à cela, le milieu contenant le virus a été retiré et nous avons remis 200 µl de milieu frais. La plaque a été remise dans l'incubateur pour 16h (un cycle de réplication virale). 16h post-infection, le milieu a été retiré et les puits ont été rincés avec 200 µl de PBS. Nous avons ajouté, dans les puits, une solution de PBS / 2% formaldéhyde (permet de fixer les cellules). Nous avons laissé le tout incuber 15min à 37°C. Après retrait de la solution, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS. 200 µl d'une solution PBS / 0.1% saponin / 1% FCS ont été ajoutés dans les puits afin de perméabiliser les cellules (NP est une protéine intracellulaire). La plaque a été incubée à température ambiante pendant 15min.

5.3 Production et contrôle qualité des NP LCMV recombinantes

En amont de ce travail, une technique de production de NP LCMV dans un système bactérien a été mise au point par Madame Ana Rita Gonçalves. Des NP LCMV produites dans des cellules d'insecte utilisant un système d'expression Baculovirus ont été commandées. La mise au point du protocole et la production des protéines a été réalisée par le Dr. Shigeru Morikawa (Chief of the Special Pathogens Laboratory, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan). Nous avons effectué la dernière étape de préparation et ressuspension des protéines (ajouter 0.5ml d'une solution 8M d'urée dans du PBS, sonication (50 Watt), centrifugation durant 10min à 8'000 tours/min et collecte du surnageant). Avant de commencer nos expériences, nous avons effectué un contrôle qualité des différentes NP recombinantes produites. L'idée étant de montrer premièrement, la présence de NP dans nos différents échantillons et deuxièmement, d'en évaluer la pureté par Coomassie Brilliant Blue Staining ainsi que par Western-blot. Nous avons, tout d'abord, fait 2 gels (separating gel : 12% / stacking gel : 4%). Au fond de chaque puits ont été déposés 10 µl d'un mélange de nos protéines dans du Sample Buffer (SB).

LCMV Arm 53b PEG : 7 µl dilués dans 10 µl de SB -> 10 µl ont été chargés.

LCMV Arm 53b Renografin : 7 µl dilués dans 10 µl de SB -> 10 µl ont été chargés.

NP bacteria : 1, 2, 4 μl dilués dans 10 μl de SB -> 10 μl de chaque dilution ont été chargés.

NP : 7 μl dilués dans 10 μl de SB -> 10 μl ont été chargés.

DeltaP : 7 μl dilués dans 10 μl de SB -> 10 μl ont été chargés.

Pour le Western-blot, nous avons choisi d'utiliser mAb 113 anti-LCMV NP de référence pour la classification de LCMV. Par définition donc, si mAb 113 ne réagit pas, le matériel présenté (virus perméabilisé, NP recombinante) n'est pas issu de LCMV.

5.4 Protocole standard pour Western-blotting

Avant de charger les échantillons sur le gel, ces derniers ont été dilués avec une solution réductrice (2x SDS-PAGE) contenant 10% de dithiothreitol (DTT) puis ont été bouillis 5min à 95°C. Pour permettre aux protéines d'atteindre le running gel, les aliquotes ont été placées sous un courant de 80V. Une fois atteint, le courant a été augmenté à 120V pendant 1h permettant la migration des échantillons et des marqueurs protéiques à travers un gel d'électrophorèse composé de 12% de SDS-polyacrylamide. Le produit de la migration a été transféré sur une membrane de nitrocellulose puis les membranes ont été bloquées par du PBST (solution de PBS avec 0.1% (wt/vol) Tween-20). Les protéines ont été détectées par incubation avec un anticorps primaire (mAb 113, dilution 1:500) durant une nuit à 4°C. Le lendemain, un anticorps secondaire (polyclonal rabbit anti-mouse Ig-HRP, dilution 1:4000) a été ajouté à température ambiante pendant 1h. Après 5 rinçages dans une solution 1X PBS 0.2% (wt/vol) Tween-20, les membranes ont été révélées à l'aide du kit LiteABlot (EuroClone, Pero, Italie).

5.5 Protocole standard pour ELISA

Pour tous les ELISAs effectués dans ce travail (sauf précision), nous avons appliqué le protocole suivant : Le virus purifié ou les NP recombinantes ont été dilués dans du PBS puis coaté (100 μl /puits) en triplicats sur une plaque à microtitre 96 puits EIA/RIA high-bond (Corning). La plaque a ensuite été entreposée pendant 16h à 6°C recouverte par un Parafilm. Le puits 12 est toujours coaté avec du 1% BSA/PBS uniquement. Après fixation, les plaques ont été lavées 3 fois avec une solution de PBST. Les liaisons non-spécifiques ont été bloquées à l'aide d'une solution 1% (wt/vol) BSA/PBS. Les anticorps primaires ont été dilués dans du 1% (wt/vol) BSA/PBS (100 μl /puits) puis incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits 11 et 12 étaient chargés uniquement avec du 1% (wt/vol) BSA/PBS. Une fois cette étape terminée, les plaques ont été lavées 3 fois dans du PBST. Les anticorps secondaires (HRP conjugués) ont été dilués dans du 1% (wt/vol) BSA/PBS, chargés dans tous les puits (100 μl /puits) puis incubés pendant 1h à température ambiante. L'étape terminée, les plaques ont été lavées 3 fois avec du PBST. Pour l'étape de révélation, une solution de OPD 1x (citrate buffer 4.5ml/OPD 500 μl /H₂O₂ 5 μl) (100 μl /puits) a été ajoutée. Après 5min, la réaction est stoppée en ajoutant une solution 3M de H₂SO₄ (100 μl /puits) dans chaque puits. L'OD a été mesuré à 405nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour la détermination du signal spécifique, nous avons soustrait aux valeurs, la valeur moyenne du signal non-spécifique produit par le BSA (puits 12).

5.6 Optimisation du coating des NP LCMV recombinantes

L'optimisation du coating a comme objectif d'être la plus économe avec l'antigène tout en gardant une sensibilité maximale du test. Pour y parvenir, nous avons donc fait une dilution en série d'un

facteur 2 de nos antigènes en commençant avec une dilution 1:10. Nous avons fait des duplicats afin d'obtenir une mesure moyenne un peu moins sensible à une éventuelle erreur de pipetage. L'idéal étant de faire des triplicats (ce que nous avons fait pour toutes les expériences suivantes). Pour la détection, mAb 113 anti-LCMV NP a été utilisé comme anticorps primaire (dilution 1 :500) pour les mêmes raisons que celles développées dans le chapitre 3.2. Nous nous attendions à détecter un signal faible avec les fortes dilutions suivi d'un domaine linéaire dans les dilutions moyennes pour atteindre un plateau vers les dilutions faibles, signe de saturation de la réaction. L'anticorps secondaire utilisé est un anti-mouse IgG HRP utilisé à une dilution 1 :1000 (dilution conseillée par le fabricant). Pour cette expérience, nous avons laissé un temps de révélation de 30min avant de bloquer la réaction. Les expériences suivantes ont un temps de révélation de 5min.

5.7 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant un anticorps monoclonal

Grâce aux résultats de l'expérience décrite au point 5.4, nous avons mesuré que le coating idéal pour les antigènes NP, DeltaP et NP bacteria est une dilution 1:80 de nos stocks. Ceci équivaut à une concentration absolue de 20 µg/ml. Le stock de LCMV Arm 53b Renografin est coaté à une dilution de 10⁶ PFU (Kunz et al., 2004). L'anticorps primaire utilisé est mAb 113 anti-LCMV NP (dilution initiale 1:100 puis, dilution en série d'un facteur 2). Cette expérience nous permettra de mesurer la perte ou le gain d'antigénicité des différents procédés de production des NP en lieu et place du virus natif. Au cas où l'antigénicité des différentes NP recombinantes est inférieure au virus, nous utiliserons le virus LCMV Arm 53b pour l'élaboration du test diagnostique. L'anticorps secondaire utilisé est de nouveau un anti-mouse IgG HRP, dilution 1 :1000.

5.8 Comparaison de l'antigénicité des NP recombinantes par rapport au virus LCMV utilisant des sérums référence de cochon d'Inde

Pour cette expérience, nous avons utilisé des sérums références de cochon d'Inde produits au Viral Immunobiology Laboratory, Scripps Research Institute (La Jolla, USA) comme anticorps primaire. Ces sérums références ont été obtenus en infectant des cochons d'Inde avec la souche référence du virus LCMV Arm 53b. Etant donné que c'est un sérum provenant d'animaux ayant reçu plusieurs « boosts », les taux d'IgG spécifiques sont plus élevés que ceux attendus dans un sérum humain après une primo-infection. C'est pourquoi nous avons fait 10 dilutions en série d'un facteur deux avec une dilution de départ de 1:5000. Comme anticorps secondaire, nous avons utilisé un anticorps anti-IgG guinea pig biotinylé (système d'amplification) à une dilution 1:2000. La streptavidine-HRP a été utilisée à une dilution 1:2000. Nous avons choisi un anticorps avec système d'amplification car nous n'avions pas d'anticorps anti-IgG guinea pig HRP en stock. Dans les expériences suivantes, nous avons optimisé la dilution de l'anticorps secondaire et fait une expérience comparative de la sensibilité entre un ELISA avec système d'amplification, d'un « ELISA classic » afin d'évaluer le gain de signal grâce au système d'amplification.

5.9 Comparaison de la sensibilité par technique ELISA versus technique IFA

Nous avons effectués, en parallèle, les deux techniques afin de pouvoir les comparer objectivement et de démontrer la supériorité d'une technique par rapport à l'autre.

ELISA : Comme anticorps primaire, nous avons utilisé des sérums cochons d'Inde anti-LCMV et Control comme anticorps primaires. Nous avons fait une dilution en série d'un facteur 2 avec une dilution de départ de 1:80000 (dilution supérieure à l'expérience du point 5.6 car les OD obtenus à l'expérience 3.4 sont trop élevés pour calculer la limite de sensibilité de la technique). Nous avons utilisé comme anticorps secondaire un anticorps anti-IgG guinea pig biotinylé puis la streptavidine-HRP, tous deux à une dilution de 1:2000.

IFA : Des cellules A549 ont tout d'abord été infectées avec le virus LCMV Arm 53b à une MOI de 0.1. Le tout a été incubé pendant 1h à 37°C. Une fois l'inoculum retiré, du milieu de culture frais a été ajouté et les cellules ont été incubées pendant 48h à 37°C (une incubation de 48h permet une expression maximale de la LCMV NP donc une sensibilité maximale de la technique). La fixation a été effectuée avec une solution de 2% de formaldéhyde dilué dans du PBS pendant 15min dans l'obscurité et à 37°C. La perméabilisation a été faite à température ambiante avec une solution de PBS/1% (v/v) FCS/0.1% (w/v) saponin. Comme anticorps primaires, nous avons utilisé les mêmes sérums que ceux utilisés pour l'ELISA mais cette fois à une dilution de départ de 1:1000 dans une solution de PBS 1% (v/v) FCS/0.1% (w/v) saponin. Nous avons laissé les cellules incuber avec les anticorps primaires pendant 2h à température ambiante. L'anticorps secondaire est un anticorps anti-IgG guinea biotinylé dilué 1:200 dans une solution de PBS 1% (v/v) FCS/0.1% (w/v) saponin que nous avons laissé incuber pendant 45min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Comme source de fluorescence, nous avons utilisé la streptavidine-Alexa 594 à une dilution 1:200 dans une solution de PBS 1% (v/v) FCS/0.1% (w/v) saponin que nous avons laissé incuber pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Une fois tout cela effectué, nous avons mis 200 µl de PBS par puits. La lecture du niveau de fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un grossissement de 5x. La plaque a été stockée à 4°C protégée de la lumière.

5.10 Comparaison de titres ELISA mesurés entre système « avec » et système « sans » amplification

Afin de pouvoir comparer objectivement le gain de signal d'un ELISA avec système d'amplification d'un ELISA sans système d'amplification, il est impératif de les réaliser en parallèle et d'en faire la lecture simultanément. Pour ce faire, nous avons dû laisser l'ELISA « classic », après sa réaction avec l'anticorps secondaire, sur glace pendant 1h (durée de l'étape d'amplification) afin de ralentir au maximum la cinétique de la réaction.

ELISA « classic » : Nous avons utilisé, comme dans les expériences précédentes, le sérum cochon d'Inde anti-LCMV comme anticorps primaire en effectuant une série de dilution d'un facteur 2 à partir d'une dilution de départ de 1:80000. L'anticorps secondaire était un anticorps anti-IgG guinea pig HRP dilué 1:2000. Une fois cette étape terminée, la plaque a été déposée sur glace pendant 1h afin de freiner au maximum la cinétique de la réaction pendant que nous devons effectuer l'étape supplémentaire propre au système d'amplification.

ELISA avec système d'amplification : Comme anticorps primaire, nous avons utilisé le même sérum aux mêmes dilutions que pour l'ELISA « classic ». L'anticorps secondaire, quant à lui, était un anticorps anti-IgG guinea pig biotinylé dilué à 1:2000. La streptavidine HRP était aussi diluée à 1:2000.

La lecture des deux techniques s'est faite en parallèle afin de s'assurer d'avoir les mêmes durées de révélation ainsi qu'une lecture réalisée dans les mêmes conditions. Seulement sous ces conditions, une comparaison était possible.

5.11 Contrôle qualité de la 2^{ème} extraction de NP et contrôle DeltaP

Pour cette deuxième extraction, nous avons suivi exactement le même protocole que celui décrit au point 5.3 pour le Coomassie Brilliant Blue Staining. En plus de cela, nous avons effectué un ELISA afin de mettre en évidence le maintien de l'antigénicité de la « NP 2^{ème} extraction » et de la non-antigénicité du « contrôle DeltaP 2^{ème} extraction ». Pour ce faire, nous avons donc utilisé le protocole déjà optimisé pour le sérum cochon d'Inde (voir sous-chapitre 5.8 ELISA « classic »).

5.12 Adaptation du test ELISA au sérum humain

Etant donné que les sérums humains ont été récoltés après une primo-infection, nous les avons moins dilués que ceux de cochon d'Inde. L'idée étant que, après une primo-infection, les titres d'anticorps spécifiques sont moins élevés qu'après plusieurs doses de rappel (comme c'est le cas pour les sérums de cochon d'Inde). A dilution égale, on aurait eu un signal pour les sérums humains qui aurait été nettement inférieur à celui des sérums cochon d'Inde. Cela n'est pas souhaitable car la sensibilité de notre test pourrait en être diminuée. Après estimation des titres, nous avons donc dilué les sérums humains d'un facteur 1:100 puis dilution en série d'un facteur 2. L'anticorps secondaire est un anticorps anti-IgG human HRP dilué à 1:3000. Comme décrit au sous-chapitre 3.8, le signal background est minimisé en ajoutant un détergeant (Tween 20) au milieu de dilution de l'anticorps primaire (sérum du patient) et secondaire. Ces solutions sont donc composées de 1% (wt/vol) BSA/PBST.

5.13 Test de spécificité de notre ELISA

Afin de pouvoir établir la courbe ROC propre à notre test, nous avons utilisé exactement le même protocole ELISA que celui détaillé au sous-chapitre 5.12.

6 REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier spécialement le Professeur Stefan Kunz de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de m'avoir encadré avec sérieux et précision tout au long de mon travail. Je tiens aussi à le remercier pour sa constante disponibilité et sa réactivité.

Je remercie toute l'équipe du Professeur Kunz pour l'accueil qui m'a été fait et la bonne ambiance de travail. Un merci particulier à Madame Marie-Laurence Moraz, doctorante au sein du laboratoire, pour sa très précieuse aide ainsi que son enseignement des différentes techniques de laboratoires.

Je remercie également Madame Ana Rita Gonçalves, doctorante au sein du laboratoire, pour la mise à disposition des échantillons de NP produite grâce au système bactérien développé par ses soins.

Je remercie aussi le Professeur Pascal Meylan d'avoir accepté d'être mon expert pour ce travail de master.

7 RÉFÉRENCES

- Barton, L. L., and Hyndman, N. J. (2000). Lymphocytic choriomeningitis virus: reemerging central nervous system pathogen. *Pediatrics*. **105**(3), E35.
- Barton, L. L., and Mets, M. B. (1999). Lymphocytic choriomeningitis virus: pediatric pathogen and fetal teratogen. *Pediatr Infect Dis J*. **18**(6), 540-1.
- Barton, L. L., and Mets, M. B. (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin Infect Dis*. **33**(3), 370-4. Epub 2001 Jul 5.
- Barton, L. L., Mets, M. B., and Beauchamp, C. L. (2002). Lymphocytic choriomeningitis virus: emerging fetal teratogen. *Am J Obstet Gynecol*. **187**(6), 1715-6.
- Beyer, W. R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D., and Lenz, O. (2003). Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* **77**(5), 2866-72.
- Bonthuis, D. J. (2009). Lymphocytic choriomeningitis virus: a prenatal and postnatal threat. *Advances in pediatrics* **56**, 75-86.
- Borio, L., Inglesby, T., Peters, C. J., Schmaljohn, A. L., Hughes, J. M., Jahrling, P. B., Ksiazek, T., Johnson, K. M., Meyerhoff, A., O'Toole, T., Ascher, M. S., Bartlett, J., Breman, J. G., Eitzen, E. M., Jr., Hamburg, M., Hauer, J., Henderson, D. A., Johnson, R. T., Kwik, G., Layton, M., Lillibridge, S., Nabel, G. J., Osterholm, M. T., Perl, T. M., Russell, P., and Tonat, K. (2002). Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* **287**(18), 2391-405.
- Borrow, P., and Oldstone, M. B. (1992). Characterization of lymphocytic choriomeningitis virus-binding protein(s): a candidate cellular receptor for the virus. *J Virol* **66**(12), 7270-81.
- Buchmeier, M. J., de la Torre, J. C., and Peters, C. J. (2007). Arenaviridae: the viruses and their replication. 4th ed. In "Fields Virology" (D. L. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. p. 1791-1828. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Childs, J. E., Glass, G. E., Korch, G. W., Ksiazek, T. G., and Leduc, J. W. (1992). Lymphocytic choriomeningitis virus infection and house mouse (*Mus musculus*) distribution in urban Baltimore. *Am J Trop Med Hyg*. **47**(1), 27-34.
- Childs, J. E., Glass, G. E., Ksiazek, T. G., Rossi, C. A., Oro, J. G., and Leduc, J. W. (1991). Human-rodent contact and infection with lymphocytic choriomeningitis and Seoul viruses in an inner-city population. *Am J Trop Med Hyg*. **44**(2), 117-21.
- Clegg, J. C. (2002). Molecular phylogeny of the arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **262**, 1-24.
- Cordey, S., Sahli, R., Moraz, M. L., Estrade, C., Morandi, L., Cherpillod, P., Charrel, R. N., Kunz, S., and Kaiser, L. (2011). Analytical validation of a lymphocytic choriomeningitis virus real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods* **177**(1), 118-22.
- de la Torre, J. C. (2009). Molecular and cell biology of the prototypic arenavirus LCMV: implications for understanding and combating hemorrhagic fever arenaviruses. *Ann N Y Acad Sci* **1171 Suppl 1**, E57-64.
- Elbers, A. R., Vecht, U., Osterhaus, A. D., Groen, J., Wisselink, H. J., Diepersloot, R. J., and Tielen, M. J. (1999). Low prevalence of antibodies against the zoonotic agents *Brucella abortus*, *Leptospira* spp., *Streptococcus suis* serotype II, hantavirus, and lymphocytic choriomeningitis virus among veterinarians and pig farmers in the southern part of The Netherlands. *Vet Q* **21**(2), 50-4.
- Emonet, S. F., de la Torre, J. C., Domingo, E., and Sevilla, N. (2009). Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect Genet Evol* **9**(4), 417-29.
- Fischer, S. A., Graham, M. B., Kuehnert, M. J., Kotton, C. N., Srinivasan, A., Marty, F. M., Comer, J. A., Guarner, J., Paddock, C. D., DeMeo, D. L., Shieh, W. J., Erickson, B. R., Bandy, U., DeMaria, A., Jr., Davis, J. P., Delmonico, F. L., Pavlin, B., Likos, A., Vincent, M. J., Sealy, T. K., Goldsmith, C. S., Jernigan, D. B., Rollin, P. E., Packard, M. M., Patel, M., Rowland, C., Helfand, R. F., Nichol,

- S. T., Fishman, J. A., Ksiazek, T., and Zaki, S. R. (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med.* **354**(21), 2235-49.
- Greenhow, T. L., and Weintrub, P. S. (2003). Your diagnosis, please. Neonate with hydrocephalus. *Pediatr Infect Dis J.* **22**(12), 1099, 1111-2.
- Kunz, S., Sevilla, N., Rojek, J. M., and Oldstone, M. B. (2004). Use of alternative receptors different than alpha-dystroglycan by selected isolates of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **325**(2), 432-45.
- Lee, A. M., Pasquato, A., and Kunz, S. (2010). Novel approaches in anti-arenaviral drug development. *Virology.*
- Lledo, L., Gegundez, M. I., Saz, J. V., Bahamontes, N., and Beltran, M. (2003a). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: analysis of sera from the general population and wild rodents. *J Med Virol.* **70**(2), 273-5.
- Lledo, L., Gegundez, M. I., Saz, J. V., Bahamontes, N., and Beltran, M. (2003b). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: analysis of sera from the general population and wild rodents. *Journal of medical virology* **70**(2), 273-5.
- McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H., and Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* **314**(1), 20-6.
- Mets, M. B., Barton, L. L., Khan, A. S., and Ksiazek, T. G. (2000). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underdiagnosed cause of congenital chorioretinitis. *Am J Ophthalmol.* **130**(2), 209-15.
- Meyer, H. M., Jr., Johnson, R. T., Crawford, I. P., Dascomb, H. E., and Rogers, N. G. (1960). Central nervous system syndromes of "vital" etiology. A study of 713 cases. *Am J Med.* **29**, 334-47.
- Milazzo, M. L., Campbell, G. L., and Fulhorst, C. F. (2011). Novel arenavirus infection in humans, United States. *Emerg Infect Dis* **17**(8), 1417-20.
- Nunberg, J. H., and York, J. (2012). The curious case of arenavirus entry, and its inhibition. *Viruses* **4**(1), 83-101.
- Oldstone, M. B. (2002). Biology and Pathogenesis of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. In "Arenaviruses" (M. B. Oldstone, Ed.), Vol. 263, pp. 83-118.
- Ortiz-Riano, E., Cheng, B. Y., de la Torre, J. C., and Martinez-Sobrido, L. (2012). Self-association of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein is mediated by its N-terminal region and is not required for its anti-interferon function. *J Virol* **86**(6), 3307-17.
- Palacios, G., Druce, J., Du, L., Tran, T., Birch, C., Briese, T., Conlan, S., Quan, P. L., Hui, J., Marshall, J., Simons, J. F., Egholm, M., Paddock, C. D., Shieh, W. J., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Catton, M., and Lipkin, W. I. (2008). A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N Engl J Med* **358**(10), 991-8.
- Parker, W. B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res* **107**(2), 165-71.
- Stephensen, C. B., Blount, S. R., Lanford, R. E., Holmes, K. V., Montali, R. J., Fleenor, M. E., and Shaw, J. F. (1992a). Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *J Med Virol.* **38**(1), 27-31.
- Stephensen, C. B., Blount, S. R., Lanford, R. E., Holmes, K. V., Montali, R. J., Fleenor, M. E., and Shaw, J. F. (1992b). Prevalence of serum antibodies against lymphocytic choriomeningitis virus in selected populations from two U.S. cities. *Journal of medical virology* **38**(1), 27-31.
- Takimoto, K., Taharaguchi, M., Morikawa, S., Ike, F., and Yamada, Y. K. (2008). Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **57**(4), 357-65.
- Urata, S., and de la Torre, J. C. (2011). Arenavirus budding. *Adv Virol* **2011**, 180326.