



HAL
open science

Cellules NK et fièvres hémorragiques virales : étude de leur rôle dans la mise en place des réponses immunes et dans la pathogenèse lors de l'infection par les virus Lassa et Ebola

Marion Russier

► **To cite this version:**

Marion Russier. Cellules NK et fièvres hémorragiques virales : étude de leur rôle dans la mise en place des réponses immunes et dans la pathogenèse lors de l'infection par les virus Lassa et Ebola. Biologie cellulaire. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2013. Français. NNT : 2013ENSL0801 . tel-00835079

HAL Id: tel-00835079

<https://theses.hal.science/tel-00835079>

Submitted on 18 Jun 2013

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.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon - Université de Lyon

Discipline :

Sciences Technologie Santé - Sciences de la vie

Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur
École Doctorale Biologie Moléculaire et Intégrative de la Cellule (ED340)

présentée et soutenue publiquement le 6 février 2013

par Mlle Marion RUSSIER

Cellules NK et fièvres hémorragiques virales :

Etude de leur rôle dans la mise en place des réponses immunes et dans la pathogenèse lors de l'infection par les virus Lassa et Ebola

Directeur de thèse : M. Sylvain BAIZE

Après l'avis de : M. Marc DALOD
M. Daniel SCOTT-ALGARA

Devant la commission d'examen formée de :

M. Sylvain BAIZE, Directeur
M. Marc DALOD, Rapporteur
M. Renaud MAHIEUX, Président
M. Sébastien PLUMET, Membre
M. Daniel SCOTT-ALGARA, Rapporteur
M. Thierry WALZER, Membre

Remerciements

J'aimerais remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ces travaux de thèse et ont contribué à leur réalisation par leurs conseils et leur soutien.

Mes premiers remerciements s'adressent à Sylvain, mon directeur de thèse sans qui rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir encadrée, soutenue, orientée, réorientée, corrigée... Merci pour nos discussions de sciences et les autres. Merci de m'avoir tenu tête à certains moments et de m'avoir fait confiance à d'autres.

Je souhaite remercier Noël Tordo pour m'avoir permis d'entrer à l'UBIVE pour mon Master un jour de septembre 2008 et de m'avoir permis de réaliser ma thèse.

Je remercie la Délégation Générale pour l'Armement pour son soutien financier, ainsi que l'Institut Pasteur pour m'avoir permis de faire ma thèse dans cette maison.

Je souhaite remercier chaleureusement mes deux rapporteurs : le Dr. Daniel Scott-Algara et le Dr. Marc Dalod pour avoir accepté de lire, corriger et juger ces travaux malgré le court délai qui leur était imparti.

Je remercie également les autres membres de mon jury de thèse : le Pr. Renaud Mahieux, le Dr. Thierry Walzer et le Dr. Sébastien Plumet d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de suivi de thèse Thierry Walzer et Marie Flamand pour leurs remarques et leurs conseils avisés. J'ai apprécié ces discussions enrichissantes qui m'ont permis non seulement de prendre du recul sur mon sujet de thèse, d'avoir un regard plus critique sur mes résultats mais également d'avancer dans mon projet de façon sereine.

Un grand merci à tous les membres de l'UBIVE. Stéphanie, pour ton soutien technique et moral sans faille, ton optimisme, tes petits plats, ta bananophobie à mourir de rire, nos craquages et pour tout le reste que je n'oublierai jamais. Audrey, pour tous tes conseils d'ex-thésarde alti-ligérienne, les brainstormings de science et les discussions sur la vie et sur le nouveau monde qu'on a créé et qui est « trop cool ». Nadège, Alex, Séverine, pour nos discussions de café et de couloirs, les séances de mots croisés qui font peut être que maintenant j'aime le thé. Awa, qui me fait me souvenir de mon M2 et à qui « je fais peur » ! Béatrice, notre maman à tous, qui, sans ses fils, n'aurait pas tant d'histoires drôles à raconter. Jean-Marc et aussi tous les membres passés que j'ai croisés.

Je souhaite vivement remercier le Dr. Hervé Raoul ainsi que toute l'équipe P4 qui m'ont permis de réaliser ces travaux au P4 sans encombre. Merci également à Caroline. Delphine, pour nos cafés et discussions voyages. Christophe et Alban pour la Biosécurité, les plannings et surtout pour ne pas avoir trop râlé pour mes journées intenses et mes sorties tardives. A tous les membres de l'équipe qui ont eu « la chance » de m'accompagner et donc forcément de m'attendre (je suis désolée !) : SM (ça y est tu es libre !), SMund, AB, FJ, LB, AV, AD, DC, JV. Merci aussi aux membres passés de l'équipe P4 : Claudie et Sandra pour m'avoir formé et Christophe pour ses bertolinades du café. Merci aussi aux agents du PCS pour leur écoute sécurisante au P4 et leur gentillesse.

Je remercie également le plateau technique de cytométrie, Sébastien et Thibault pour leurs conseils.

Une pensée pour les thésards autour de moi. Que la force soit avec vous ! A tous mes collègues de scaphandre que ne se sont jamais plaint de mon retard et pour leur discussions sympathiques pendant les incub. Marie (vive les rollers, la raclette et les nuages, ...), Kévin, Cyrille, Raquel, Oliver(s), Valentina et les autres.

Jo, Marion, Charlène, Marina et Ludo pour toutes ces dernières années avec vous, les soirées, les cafés, les restos, les repas, les quatre-heures, les mariages, le shopping, nos débats sur la recherche et puis la vie aussi, les soirées de détente et les soirées délirantes. Jo, merci pour ton soutien inébranlable en prépa, à l'ENS, en pause café au Cervi, en coloc, au sport, en soirée, bref tout le temps dès que j'en avais besoin. Je croise les doigts pour chacune de vos thèses à tous, vous allez tout déchirer. Vive HHV-6, HCV, les hyperthermophiles, les plantes et l'épigénétique des cellules souches, je sais il n'y a pas que ça !

Méli, parce que notre passion commune des voyages me rappelle qu'il y a un monde parallèle de la thèse qui est génial aussi. Vivement que je puisse à nouveau l'explorer.

Delphine, Jenny, Flo et Sophie, pour notre virée au Burkina et notre « proximité » de chaque instant, notre deuxième virée à Londres et les suivantes !

Emilie, Elo, Zozo, et encore Jo pour ces années de prépa que je n'oublierai jamais et la suite. Vous étiez là et m'avez toujours soutenu pour que je grimpe la toute première marche. Et je suis fière de vous toutes !

A mes amis de la danse qui se reconnaîtront et m'ont sorti la tête de mes études et de ma thèse.

Laura, pour ton amitié depuis le collège et pour me rappeler tous les jours que tout est possible ! Charlotte, pour les potions magiques et les bonshommes de neige et le reste ! Juline, pour avoir dit un jour « je voudrais faire de la recherche et toi ? ». Laeti, pour me rappeler qu'il y a quelque chose à côté de tout ça ! Et tous les autres !

A toute ma famille qui a toujours été là, fière de moi. Mes parents, pour avoir cru en moi depuis toujours. Sim, qu'est-ce que je ferai sans toi et tes histoires (et désolé d'avoir un caractère de m...ammouth)?!

A mon chéri. Je me demande encore comment tu fais pour me supporter tout le temps et surtout pendant ces derniers mois. Merci de ton soutien, de nos voyages et de notre quotidien et merci me faire vivre une vie de princesse dans tous les sens du terme !

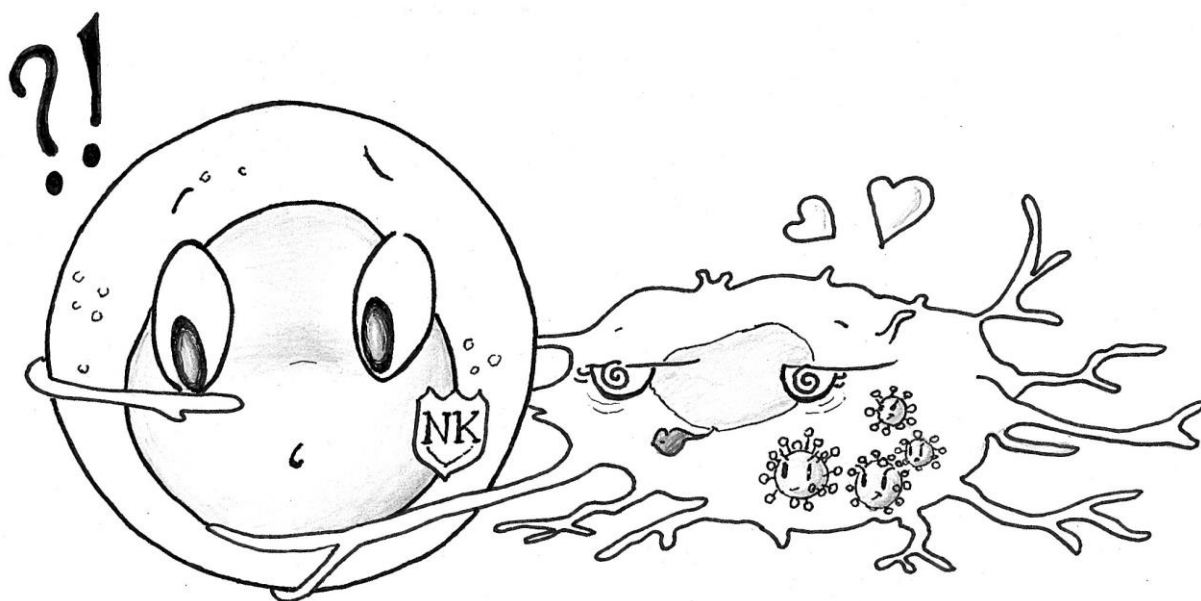


Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
RESUME	13
ABSTRACT	15
ABREVIATIONS.....	17
INTRODUCTION.....	19
LES FIEVRES HEMORRAGIQUES VIRALES	21
<i>Les Bunyaviridae</i>	21
<i>Les Flaviviridae</i>	22
<i>Les Arénaviridae</i>	22
<i>Les Filoviridae</i>	23
LE VIRUS LASSA	28
<i>Epidémiologie</i>	28
• Découverte et premières épidémies observées	28
• Réémergence de LASV : de nouvelles épidémies.....	29
• Importation de LASV dans les pays développés.....	29
<i>Transmission et propagation de LASV</i>	32
<i>Séroprévalence</i>	33
<i>Diagnostic</i>	33
<i>Signes cliniques et physiopathogénèse</i>	35
<i>Modèles animaux d'étude de la fièvre de Lassa</i>	38
• Rongeurs.....	38
• Primates non humains	40
<i>Aspects moléculaires</i>	43
• Morphologie.....	43
• Organisation du génome	44
• Les protéines virales	45
– La nucléoprotéine	45
– Les glycoprotéines 1 et 2	46
– La polymérase L.....	49
– La protéine Z	49
• Le cycle viral.....	50
– Entrée du virus dans la cellule.....	50
– Transcription et réplication virale	52
– Bourgeonnement.....	53
• Les outils	54
<i>Traitements de la fièvre de Lassa</i>	56
– La ribavirine	56
– Recherche de nouveaux traitements	57
<i>Un arénavirus non pathogène : le virus Mopeia</i>	60
LES REPONSES IMMUNITAIRES LORS DE LA FIEVRE DE LASSA	63
<i>La réponse innée</i>	63
• Infection des cellules présentatrices d'antigène	63

–	Activation des CPA	63
–	Conséquences sur la réponse immunitaire innée et adaptative	64
•	La reconnaissance de l'antigène.....	65
–	Notion de PRR et de PAMP	65
–	La reconnaissance de LASV : hypothèses	66
–	Inhibition de la synthèse d'IFN : rôle des protéines virales	67
•	Réponse IFN de type I	69
•	La réponse inflammatoire	70
	La réponse adaptative	72
•	La réponse humorale	72
–	Sécrétion d'anticorps	72
–	Essais de traitement par injection de sérum immun	72
•	La réponse T	74
–	Activation des cellules T	74
–	Rôle dans la pathogenèse.....	76
	Vers un vaccin ?	79
–	Vecteur arénavirus	79
–	Vecteurs ADN	81
–	Conclusion : quelles méthodes pour un vaccin efficace ?	83
	UN AUTRE VIRUS RESPONSABLE DE FH : LE VIRUS EBOLA.....	85
	Aspects moléculaires.....	85
•	Morphologie et organisation du génome	85
•	Les protéines des Ebolavirus et leurs fonctions.....	85
•	Le cycle viral	87
	Epidémiologie.....	88
•	Découverte des Ebolavirus.....	88
•	Réservoir du virus et transmission à l'homme.....	89
	Signes cliniques et pathogenèse	91
•	Modèles animaux utilisés	91
•	Signes cliniques	91
•	Pathogenèse	92
	Réponses immunes lors de la FH Ebola	94
•	Infection des CPA et conséquences.....	94
•	La réponse inflammatoire	94
•	La réponse IFN de type I	94
•	La réponse humorale	95
•	Réponse T	95
•	Inhibition des réponses immunes par les protéines virales	96
	Diagnostic et traitements.....	97
	LES CELLULES NATURAL KILLER, CARREFOUR ENTRE IMMUNITE INNEE ET ADAPTATIVE.....	100
	Biologie des cellules NK.....	100
•	Développement des cellules NK et sous-populations.....	100
•	Le répertoire NK	101
–	Transduction du signal d'activation des cellules NK	102
–	Récepteurs reconnaissant le CMH-I	104
–	Récepteurs activateurs.....	105
–	Récepteurs de cytokines et chemokines	107
•	Les fonctions effectrices des cellules NK	107
–	Les fonctions cytotoxiques.....	107
–	La production de cytokines	108
	Régulation des réponses des cellules NK	109
•	Activation des cellules NK.....	109

•	Activation des DC	110
•	Lyse des DC	111
	<i>Rôle des NK dans les infections virales</i>	112
•	Conséquences de l'infection virale sur les cellules NK	112
•	Coopération avec les DC et macrophages	113
•	Rôle immunopathologique des cellules NK	114
•	Un exemple : rôle des cellules NK lors de l'infection par LCMV	114
	PROBLEMATIQUE	117
	RESULTATS	121
	INFECTION DES CELLULES NK PAR LASV ET MOPV	123
	PRESENTATION DU MODELE <i>IN VITRO</i> DE COCULTURE NK/CPA	126
	COCULTURE NK/CPA ET INFECTION PAR LASV ET MOPV	128
	<i>Etat d'activation des DC et macrophages en présence de cellules NK</i>	128
	<i>Activation/prolifération des cellules NK en présence de CPA infectées par LASV et MOPV</i>	130
	<i>Production de cytokines par les cellules NK</i>	134
	<i>Fonctions cytotoxiques</i>	136
	ETUDE DE L'IMPORTANCE DU CONTACT CELLULAIRE DANS LES INTERACTIONS NK/MACROPHAGES	140
	ETUDE DU ROLE DES FACTEURS SOLUBLES DANS LES INTERACTIONS NK/MACROPHAGES	143
	UTILISATION DE LASV RECOMBINANTS POUR L'ETUDE DU ROLE DES IFN DE TYPE I	145
	<i>Etat d'activation des DC et macrophages infectés par des LASV recombinants</i>	145
	<i>Activation des cellules NK par les CPA infectées par des LASV recombinants</i>	146
	<i>Fonctions effectrices des cellules NK</i>	149
	<i>Contact cellulaire</i>	150
	<i>Neutralisation des IFN de type I</i>	153
	ACTIVATION DES CELLULES NK LORS DE L'INFECTION PAR EBOV	155
	<i>Effet d'EBOV sur les cellules NK</i>	155
	<i>Coculture NK/CPA lors de l'infection par EBOV</i>	157
•	Activation des CPA	157
•	Activation des cellules NK	160
	DISCUSSION	165
	LE MODELE DE COCULTURE NK/CPA	167
	LES CELLULES NK NE SONT PAS INFECTABLES NI ACTIVEES EN REPONSE A LASV ET MOPV	170
	LES CELLULES NK NE S'ACTIVENT PAS EN PRESENCE DE DC INFECTEES PAR LASV ET MOPV	172
	LES CELLULES NK S'ACTIVENT EN PRESENCE DE MACROPHAGES INFECTES PAR LASV ET MOPV	174
	LES CELLULES NK ACTIVEES PAR LES MACROPHAGES INFECTES NE PRODUISENT PAS DE CYTOKINES	181
	LES CELLULES NK ACTIVEES PAR LES MACROPHAGES INFECTES PAR LASV ET MOPV ONT DES CAPACITES CYTOTOXIQUES AUGMENTEES	184
	LES CELLULES NK ACTIVEES NE LYSENT PAS LES CELLULES INFECTES	185
	LES CELLULES NK S'ACTIVENT EN PRESENCE DE DC ET DE MACROPHAGES INFECTES PAR DES LASV MUTANTS ..	189
	NI LES CELLULES NK, NI LES CPA NE SONT ACTIVEES LORS DE L'INFECTION PAR EBOV	192
	CONCLUSIONS GENERALES/PERSPECTIVES	197
	MATERIELS & METHODES	201
	RÉFÉRENCES	211
	ANNEXES	241

Table des illustrations

Figure 1. Carte représentant les zones d'endémicités et les cas reportés de FH virales.....	25
Figure 2. Arbre phylogénétique représentant l'évolution des différents lignages d'Arénavirus et de LASV.....	26
Figure 3. Arbre phylogénétique des Filovirus.....	27
Figure 4. Photographies de LASV dans des cultures de cellules Vero.....	43
Figure 5. Organisation des particules et du génome des Arénavirus.....	44
Figure 6. Domaines structuraux et fonctionnels de la NP de LASV.....	46
Figure 7. Schéma représentant les domaines structuraux de la GPC et les fonctions associées. Modèle de la conformation d'un monomère de GP.....	48
Figure 8. Entrée de LASV dans la cellule cible.....	52
Figure 9. Schéma de la transcription et réplication du segment S du génome viral.....	53
Figure 10. Bourgeonnement des particules virales.....	53
Figure 11. Schéma de génétique inverse.....	55
Figure 12. Modèle simplifié du rôle de la NP dans l'inhibition de la production d'IFN de type I et des réponses immunes.....	68
Figure 13. Comparaison des réponses immunes induites <i>in vitro</i> lors de l'infection de DC et macrophages par LASV et MOPV.....	78
Figure 14. Premières photographie d'EBOV. Organisation des particules virales et du génome d'EBOV..	86
Figure 15. Modèle de pathogenèse de la FH Ebola.....	96
Figure 16. Régulation de l'activation des fonctions des cellules NK.....	103
Figure 17. Organisation structurale de certains récepteurs et des protéines adaptatrices associées à la surface des cellules NK.....	103
Figure 18. Voies d'induction de la mort cellulaire par les cellules NK.....	108
Figure 19. Régulation des réponses immunes par les interactions entre les cellules NK et les CPA.....	111
Figure 20. Infection des cellules NK par LASV et MOPV.....	124
Figure 21. Présentation du modèle <i>in vitro</i> de coculture NK/CPA.....	127
Figure 22. Etat d'activation des macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV.....	129

Figure 23. Activation/prolifération des cellules NK en présence de CPA infectées par LASV et MOPV.....	132
Figure 24. Production de cytokines par les cellules NK lors de l'infection par LASV et MOPV.....	135
Figure 25. Analyse de la lyse des CPA infectées par LASV et MOPV.....	138
Figure 26. Etude de l'importance du contact cellulaire dans les interactions NK/macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV.....	141
Figure 27. Etude du rôle des facteurs solubles dans les interactions NK/macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV.....	144
Figure 28. Etat d'activation des cellules NK en présence de CPA infectées par des LASV recombinants.....	147
Figure 29. Etude des capacités cytotoxiques des cellules NK en présence de CPA infectées par des LASV recombinants.....	150
Figure 30. Etude de l'importance du contact cellulaire dans les interactions NK/CPA lors de l'infection par des LASV recombinants.....	152
Figure 31. Neutralisation des IFN de type I lors de l'infection par des LASV recombinants.....	153
Figure 32. Effet d'EBOV sur les cellules NK.....	156
Figure 33. Activation des CPA lors de l'infection par EBOV.....	158
Figure 34. Activation des cellules NK en présence de CPA infectées par EBOV.....	161
Figure 35. Production de cytokines par les cellules NK en présence de CPA infectées par EBOV.....	162
Figure 36. Fonction cytotoxiques des cellules NK en présence de CPA infectées par EBOV.....	163
Figure 37. Modèle décrivant les réponses immunes induites lors de l'infection par LASV.....	198
Tableau I. Epidémies de fièvre de Lassa dans les pays endémiques.....	30
Tableau II. Cas importés de fièvre de Lassa en dehors des pays endémiques.....	31
Tableau III. Comparaison entre les séquences de LASV-AV et MOPV-AN21366.....	62
Tableau IV. Réponses immunitaires innée et adaptative développées lors de l'infection par LASV.....	77
Tableau V. Epidémies de FH à Ebolavirus.....	90
Tableau VI. Bilan des réponses des cellules NK induites en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV.....	174

Résumé

Les fièvres hémorragiques à virus Lassa (LASV) et Ebola (EBOV) représentent un important problème de santé publique en Afrique. Les réponses immunes et la pathogenèse associées à ces maladies sont peu connues. Les cellules NK ont un rôle important dans la réponse immune innée par leurs propriétés cytotoxiques, mais également dans l'induction des réponses adaptatives par leur production de cytokines et leurs interactions avec les cellules dendritiques (DC) et les macrophages. Ce projet s'attache à comprendre le rôle des cellules NK dans le contrôle de la réplication virale et dans l'induction des réponses immunitaires au cours de l'infection par LASV et EBOV.

Un modèle *in vitro* de coculture de cellules NK humaines avec des DC et macrophages autologues a été développé. L'activation des cellules, la production de cytokines, la prolifération et la lyse induite par les cellules NK ont été analysées après l'infection par LASV et EBOV. Par ailleurs, les réponses des cellules NK en réponse à LASV ont été comparées avec celles induites lors de l'infection par le virus Mopeia (MOPV), très proche de LASV mais non pathogène pour l'homme.

Nous avons montré qu'en présence de macrophages infectés par LASV ou MOPV, les cellules NK s'activent, prolifèrent et ont des capacités cytotoxiques augmentées. Cette réponse dépend à la fois des contacts cellulaires et de la réponse IFN de type I. Toutefois, ces cellules ne sont pas capables de lyser les cellules infectées et ne produisent pas d'IFN- γ . En revanche, les cellules NK ne sont pas activées en présence de DC infectées par LASV et MOPV.

Nous avons ensuite disséqué l'importance de la réponse IFN de type I dans l'activation des cellules NK en utilisant des LASV recombinants mutés dans la séquence de la nucléoprotéine obtenus par génétique inverse et induisant la sécrétion de très fortes quantités d'IFN de type I. Les cellules NK s'activent et sont capables de lyser les cellules infectées lorsqu'elles sont stimulées par les macrophages mais également par les DC infectées par ces virus mutants. Cependant, de façon surprenante, les IFN de type I sécrétés en réponse à ces virus ne sont pas impliqués dans l'activation des cellules NK.

L'infection par EBOV, comme LASV, n'induit pas l'activation des cellules NK en présence de DC. Les cellules NK ne sont que faiblement activées en présence de macrophages infectés par EBOV. Elles ne sécrètent pas de cytokines et leurs capacités cytotoxiques restent inchangées lors de l'infection par EBOV. Ces résultats permettent d'améliorer la compréhension des réponses immunes et des mécanismes de pathogenèse mis en place lors des fièvres hémorragiques Lassa et Ebola.

Abstract

The hemorrhagic fevers caused by Lassa (LASV) and Ebola (EBOV) viruses are important problems of public health in Africa. The immune responses and the pathogenesis associated with these diseases are unknown. NK cells are at the crossroads between the innate and adaptive immune responses through their abilities to secrete cytokines and kill the infected cells. The interactions between NK cells and dendritic cells (DC) or macrophages potentiate the immune responses. This project aims to understand the role of NK cells in the control of viral replication and in the induction of immune responses during LASV and EBOV infection.

An *in vitro* model of coculture of human NK cells with autologous DC or macrophages has been set up. Cell activation, cytokine production, proliferation and NK cell-mediated killing were analyzed after the infection with LASV or EBOV. In addition, NK cell functions in response to LASV were compared with those induced during Mopeia virus (MOPV) infection, closely related to LASV but not pathogenic for humans.

Here, we show that in the presence of LASV- or MOPV-infected macrophages, NK cells are activated, proliferate and have increased cytotoxic capacity. This process involves cell contact and type I IFN. However, these cells are neither able to kill the infected cells nor produce IFN- γ . In contrast, NK cells are not activated in the presence of LASV- or MOPV-infected DC.

The importance of type I IFN response was further analysed by using reverse genetic recombinant LASV which hold a mutated nucleoprotein and which induce the secretion of high amounts of type I IFN. NK cells are activated and are able to kill the infected cells when stimulated by macrophages and DC infected by these mutant viruses. Surprisingly, the type I IFN which are secreted in response to these viruses are not involved in NK cell activation.

EBOV infection does not lead to NK cell activation in the presence of DC. EBOC-infected macrophages induce low NK cell activation with no cytokine production or cytotoxicity.

These results allow to better understand the immune responses and the mechanisms of pathogenesis associated with Lassa and Ebola hemorrhagic fevers.

Abréviations

Les abréviations correspondent aussi bien aux formes singulières que plurielles. Les abréviations des noms de virus ont été choisies selon la dénomination acceptée par le Comité International de Taxonomie des Virus (9^{ème} rapport). De plus, afin de simplifier et d'éviter les confusions, la forme anglaise de certaines abréviations est préférée.

α-DG : α-dystroglycane

ADNc : ADN complémentaire

ALT : alanine aminotransférase

ARNm : ARN messenger

AST : aspartate aminotransférase

BrdU : bromodéoxyuridine

CAT : chloramphenicol acetyltransferase

CD : *cluster of differentiation*

CDC : *Center for disease control*

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

Ct : *cycle threshold*

Cy : cyanine

DC : *dendritic cell*

DMEM : *Dulbecco modified Eagle's medium*

EBOV : virus Ebola Zaïre

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ELISpot : *enzyme-linked immunospot*

ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport*

FFU : *focus-forming units*

FH : fièvre hémorragique

FITC : *fluorescein isothiocyanate*

GM-CSF : *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*

GP : glycoprotéine

GPC : précurseur de la GP

Grz : Granzyme

HIV : virus de l'immunodéficience humaine

HLA : *human leucocyte antigen*

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IRF-3 : *IFN regulatory factor 3*

ISG : *IFN-stimulated gene*

ITAM : *immunoreceptor tyrosine based activation motif*

ITIM : *immunoreceptor tyrosine based inhibition motif*

JAK : *Janus-activated kinase*

JUNV : virus Junin

KIR : *killer cell Ig-like receptor*

LASV : virus Lassa

LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire

LPS : lipopolysaccharide

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

M-CSF : *macrophage colony stimulating factor*

MDA-5 : *melanoma differentiation-associated gene 5*

MOPV : virus Mopeia

MVB : corps multivésiculaires

NCR : *natural cytotoxicity receptor*

NK : *Natural Killer*

NP : nucléoprotéine

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*

PBL : lymphocytes du sang périphériques

PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique

PBS : *phosphate buffered saline*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PE : *phycoerythrine*

PHA : phytohémagglutinine

PI₃K : phosphatidyl inositol 3-kinase

PICV : virus Pichinde

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

PML : protéine de la leucémie promyélocytaire

PNH : primate non humain

Poly (I:C) : *polyinosinic:polycytidylic acid*

PRR : *pathogen-recognition receptor*

RDC : République Démocratique du Congo

rg-EBOV : souche EBOV adaptée aux rongeurs

RIG-I : *retinoic acid-inducible gene I*

RNP : complexe ribonucléoprotéique

RT : transcription inverse

SNC : système nerveux central

SSP : peptide signal stable

STAT : *signal transducer and activator of transcription*

SVF : sérum de veau foetal

TLR : récepteur *Toll-like*

TNF : *tumor necrosis factor*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

ULBP : *UL16-binding proteins*

VACV : virus de la vaccine

VEEV : virus de l'encéphalite équine vénézuélienne

VLP : *Virus-like particles*

VP : protéine du virion

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

Introduction

Les fièvres hémorragiques virales

Les fièvres hémorragiques (FH) regroupent des maladies ayant des symptômes communs. Les premiers signes cliniques sont peu spécifiques (fièvre, maux de tête, douleurs, fatigue). Les FH sont ensuite caractérisées par l'apparition de signes hémorragiques internes ou externes qui peuvent être modérés ou sévères. La mort est la conséquence d'une atteinte multi-organique et d'un choc hypoxique, hypotensif et hypovolémique. Les virus responsables de FH appartiennent à 4 familles différentes: Bunyaviridae, Flaviviridae, Arénaviridae et Filoviridae. Une cinquième famille, les Rhabdoviridae (et notamment le virus Bas-Congo) est dorénavant à prendre en compte dans ce groupe de par son implication dans une FH ayant récemment émergé en République Démocratique du Congo (RDC) [3]. Bien que les pathologies associées soient similaires, ces virus ont des localisations géographiques, des modes de transmission et des réservoirs différents [4]. Les zones d'endémicité et les cas reportés de FH sont indiqués sur la carte en figure 1.

Les Bunyaviridae

Parmi les Bunyaviridae, le virus de la FH de Crimée-Congo, est hébergé par des tiques et sévit en Asie, Afrique et Europe et plus particulièrement en Iran, dans le sud de la Russie, dans certains pays des Balkans et en Turquie [5]. Les symptômes ont été décrits pendant la seconde guerre mondiale chez des militaires en Crimée et le virus a été isolé en 1956 chez un patient au Congo.

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift a été découvert en 1930. Il est transmis par les moustiques en Afrique de l'est de l'Égypte à Madagascar mais aussi en Mauritanie et dans certains pays du Moyen Orient. Il touche aussi bien les ruminants que les hommes. Dans la majorité des cas, l'homme infecté ne développe qu'un syndrome fébrile mais la maladie peut progresser chez certains patients vers une FH avec des atteintes neurologiques et une cécité [6].

Les Hantavirus (Hantaan, Puumala, Séoul, Dobrava, Sin Nombre, Andes) sont les seuls virus de la famille des Bunyaviridae transmis par les rongeurs. Ils sont responsables d'une FH à syndrome rénal ou pulmonaire dans les zones tempérées [7]. Le virus Sin Nombre, mis en cause pendant l'été 2012 dans le parc naturel de Yosemite aux États-Unis, cause une FH à syndrome pulmonaire avec une mortalité d'environ 30%.

Les Flaviviridae

Les Flaviviridae sont des arbovirus. Parmi eux, le virus de la fièvre jaune n'a été isolé qu'au début du XX^{ème} siècle mais la maladie avait été décrite dès le XVII^{ème} siècle. Il sévit en Afrique, du Sénégal au Kenya, et en Amérique du Sud, hébergé par les moustiques.

Le virus de la dengue, également transmis par des moustiques, est endémique dans tous les pays tropicaux. La maladie comporte une forme hémorragique mortelle qui a été décrite pour la première fois aux Philippines en 1954 [8].

D'autres Flaviviridae sont responsables de cas de FH plus sporadiques comme le virus de la FH d'Omsk en Sibérie occidentale et le virus de la forêt de Kyasanur en Asie du sud, tous deux transmis par des tiques [9].

Les Arénaviridae

La famille des Arénaviridae contient un unique genre Arénavirus qui contient 22 espèces [10]. Tous les Arénavirus ont pour réservoir des rongeurs à l'exception du virus Tacaribe qui est transmis par les chauves-souris frugivores.

On compte actuellement huit Arénavirus responsables de FH. Ils ont été classés par le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) comme des pathogènes de catégorie A dont la manipulation requiert un confinement de sécurité de niveau 4. Le virus Lassa (LASV) a été isolé en 1969 et est endémique en Afrique de l'ouest. Le virus Lujo a été récemment découvert dans un hôpital d'Afrique du Sud chez un patient ayant séjourné en Zambie. Ce dernier a ensuite transmis le virus à quatre autres personnes par voie nosocomiale [11, 12]. En Amérique Latine sévissent les virus Junin (JUNV), Machupo, Guanarito, Sabia et Chapare qui causent une FH avec un taux de mortalité élevé d'environ 25%. JUNV a été isolé en 1958 en Argentine [13]. Le virus Machupo a été décrit en 1962 à l'est de la Bolivie [14]. Le virus Guanarito a été découvert au Vénézuéla lors d'une épidémie en septembre 1989 [15]. Le virus Sabia a été découvert chez un patient mort de FH en 1990 à São Paulo au Brésil [16]. Quelques cas de FH dans une région rurale près de Cochabamba en Bolivie de décembre 2003 à janvier 2004 ont permis de mettre en évidence le virus Chapare [17]. Enfin, en 2000, le virus Whitewater Arroyo a été associé à trois cas fatals en Californie [18].

Les Arénavirus ne sont pas tous associés à une FH. Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), par exemple, est responsable de méningites aseptiques et/ou d'encéphalites et d'atteintes cérébrales congénitales. C'est le prototype de la famille des Arénaviridae. Il a été découvert en 1933

après des passages en série chez le singe d'échantillons humains provenant d'un patient mort d'une encéphalite [19].

Les Arénavirus sont classés en deux complexes d'après des données sur leurs propriétés antigéniques et des analyses phylogénétiques : les Arénavirus de l'ancien monde ou sérocomplexe LCMV-LASV et les Arénavirus du nouveau monde ou sérocomplexe Tacaribe [20]. Le lignage de l'ancien monde comprend actuellement 12 espèces de virus: Dandenong, Gbagroube, Ippy, Kodoko, LASV, LCMV, Lujo, Menekre, Mérino Walk, Mobala, Mopeia et Morogoro. Le lignage du nouveau monde est divisé en trois groupes distincts A, B et C. Le groupe A comprend 5 virus (Allpahuayo, Flexal, Parana, Pichinde et Pirital), le groupe B huit virus (Amapari, Chapare, Cupixi, Guanarito, Junin, Machupo, Tacaribe et Sabia) et le groupe C deux virus (Latino et Oliveros). Il existe également des Arénavirus du nouveau monde appartenant à un groupe recombinant A-B comme le virus Whitewater Arroyo. Un arbre phylogénétique représentant les relations de proximité entre les différents Arénavirus est présenté dans la figure 2A.

Différentes souches de LASV ont été isolées des patients au cours des épidémies. La proximité phylogénétique entre ces souches est représentée dans l'arbre de la figure 2B. Les souches se classent en 4 lignages. Les lignages I, II et III regroupent des souches trouvées au Nigéria et le lignage IV des souches de la zone Sierra Leone/Libéria/Guinée [21]. La souche LASV-AV, utilisée par la suite dans la partie « Résultats » de ce manuscrit, diffère de 20% dans la séquence nucléotidique par rapport aux autres souches connues Josiah, Nigéria et LP. Les données montrent qu'elle est cependant plus proche de la souche Josiah de Sierra Leone [22].

Les Filoviridae

Parmi les Filoviridae, les virus Ebola et Marburg sont responsables de FH avec des taux de mortalité très élevés. Ils ont pour origine des pays d'Afrique centrale. Les Filoviridae se transmettent vraisemblablement par un réservoir unique : les chauves-souris. Le virus Marburg a émergé en 1967 en Allemagne suite à l'infection d'agents de laboratoire qui travaillaient sur des singes importés d'Ouganda [23]. Le virus Ebola a été détecté en 1976 lors d'épidémies au Soudan et en République du Congo (ex-Zaïre) [24, 25].

Le 9^{ème} rapport du Comité International de Taxonomie des Virus a récemment statué sur la nomenclature des Filovirus [26] (Figure 3). La famille des Filoviridae appartient à l'ordre des Mononegavirales. Elle comprend deux genres principaux : Ebolavirus et Marburgvirus. Le genre Ebolavirus comprend cinq espèces ebolavirus: Bundibugyo (BDBV), Reston (RESTV), Soudan (SUDV), Taï Forest (TAFV, anciennement appelé Côte d'Ivoire) et Zaïre (EBOV). Un seul virus

constitue chacune de ces espèces. L'appellation virus Ebola (EBOV) réfère désormais au virus de l'espèce Zaïre. Le genre Marburgvirus comprend une unique espèce marburg qui inclut les virus Marburg et Ravn. Il est proposé qu'un nouveau genre, Cuevavirus, intègre la famille des Filoviridae. Le genre Cuevavirus ne comprend qu'une seule espèce, à laquelle appartient le virus Lloviu, découvert récemment chez des chauves-souris insectivores en Espagne [27].

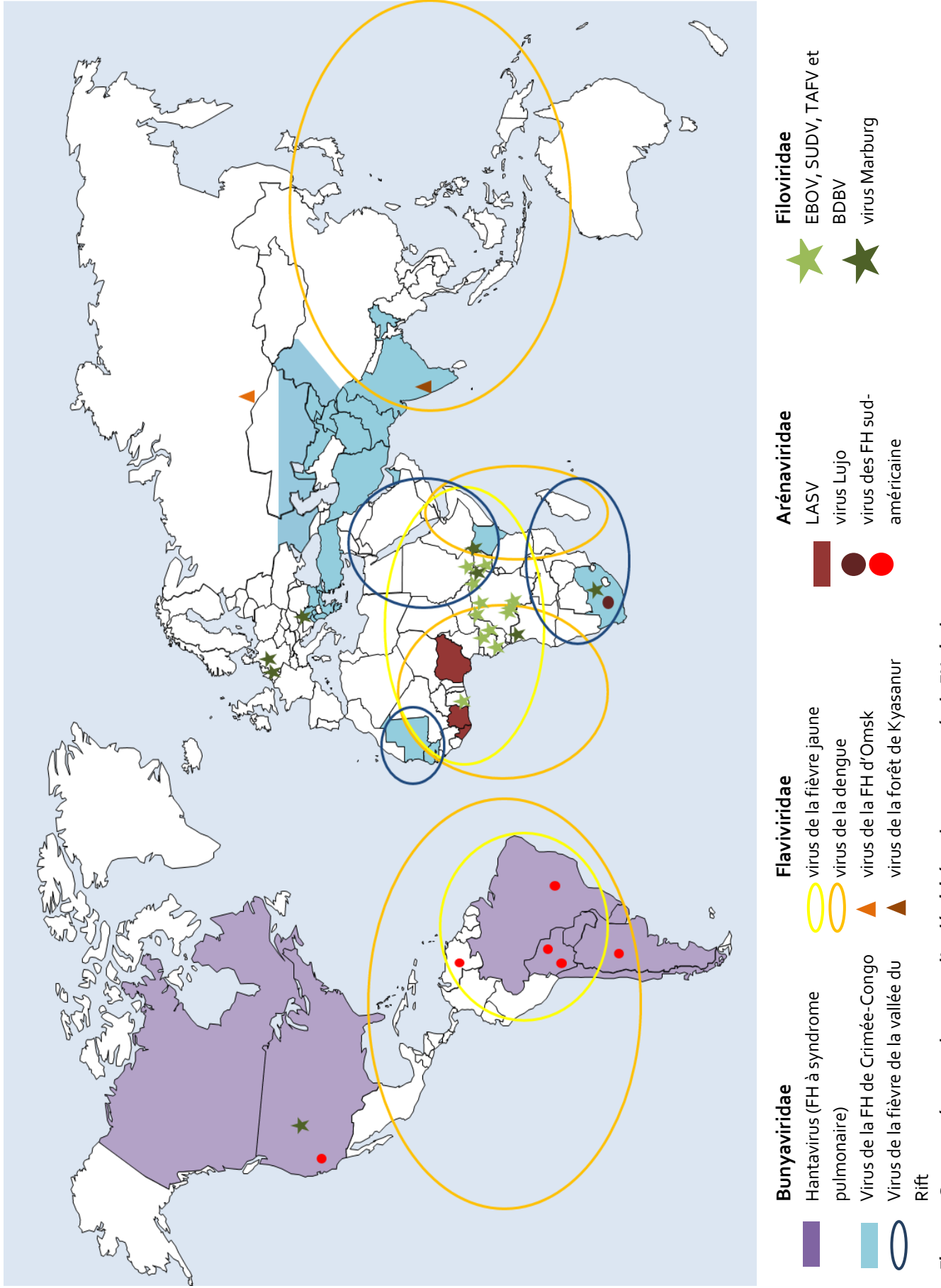
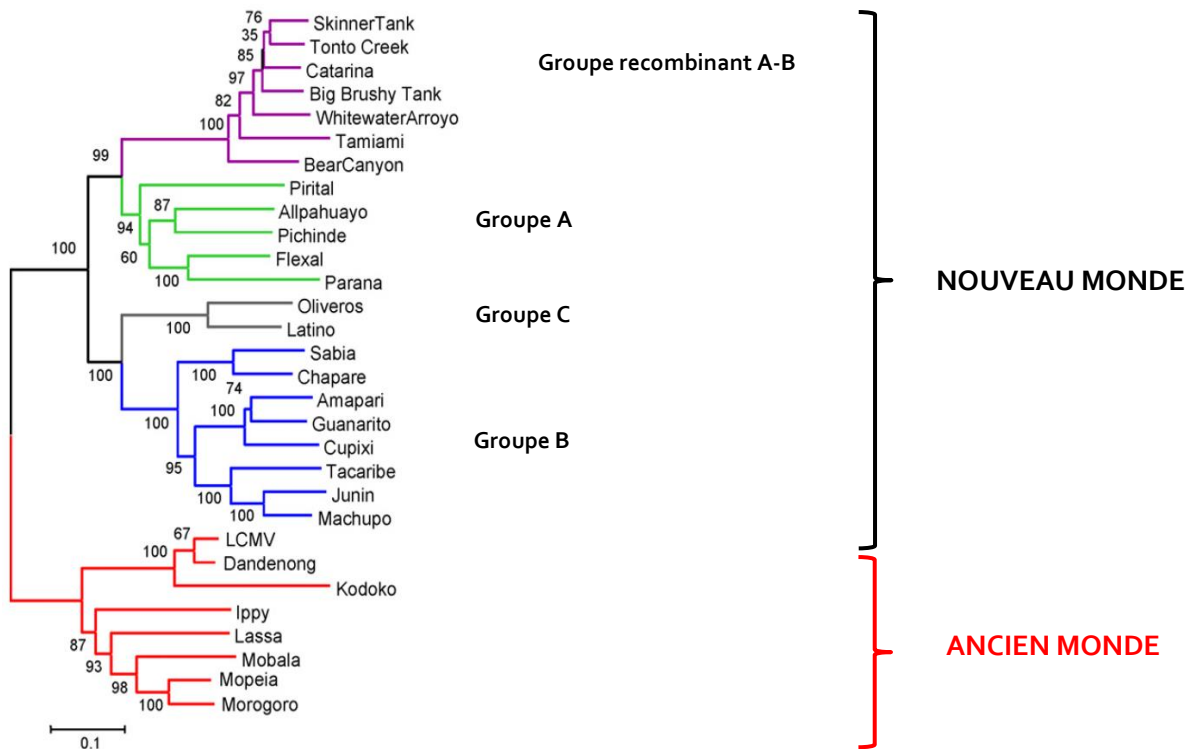


Figure 1. Carte représentant les zones d'endémicités et les cas reportés de FH virales.

A



B

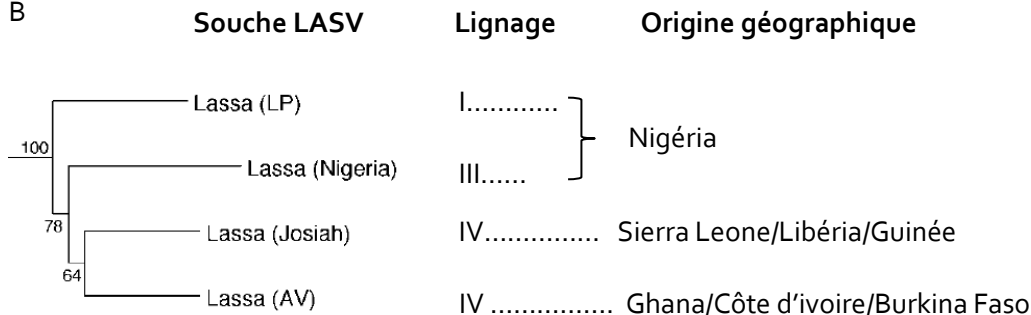


Figure 2. A. Arbre phylogénétique représentant l'évolution des différents lignages d'Arénavirus. Les relations de proximité des virus se basent sur la comparaison de la séquence d'acides aminés de la nucléoprotéine (NP) et de l'analyse grâce aux algorithmes de Neighbor-Joining, poisson et bootstrapping. Tiré et adapté de [10]. Les virus Gbagroupe, Menekre et Lujo, découverts récemment ne figurent pas sur cet arbre. Il est montré que, selon les alignements de la séquence protéique de la NP, le virus Gbagroupe est plus proche de LASV, le virus Menekre est plus proche du virus Ippy [28] et enfin le virus Lujo est le plus distant phylogénétiquement des Arénavirus de l'ancien monde [12]. **B. Arbre phylogénétique des différentes souches de LASV obtenu par analyse avec la méthode de Neighbor-Joining d'un fragment du gène NP.** D'après [21, 22]. La longueur des branches de l'arbre représente la distance phylogénétique entre les virus et la valeur de bootstrap (en %) est indiquée à la base des branches.

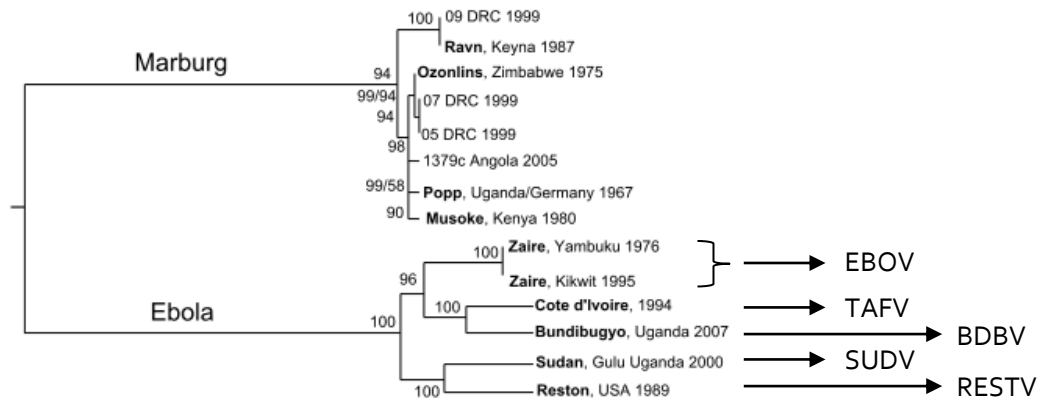


Figure 3. Arbre phylogénétique des Filovirus obtenu par comparaison des séquences complètes des génomes des Ebolavirus et Marburgvirus. La longueur des branches de l'arbre représente la distance phylogénétique entre les virus et la valeur de bootstrap est indiquée à la base des branches. Tiré de [29].

Le virus Lassa

Epidémiologie

- *Découverte et premières épidémies observées*

LASV a été décrit pour la première fois en 1970 après l'apparition de trois cas au Nigéria [30]. Le premier cas était une infirmière qui travaillait à l'hôpital de Jos. Elle est décédée le 26 janvier 1969 après avoir contaminé deux autres infirmières. L'une est décédée mais l'autre a survécu. La maladie a été dénommée fièvre de Lassa en référence au village d'origine du premier patient. De nombreuses recherches ont tenté d'identifier l'agent infectieux et LASV a été finalement isolé sur cellules à partir d'échantillons de lavages de gorge, de fluides pleuraux, de plasma et d'urine des patients [31]. Au cours de ces manipulations aux Etats-Unis, deux agents de laboratoire se sont contaminés en travaillant avec des cultures et des souris infectées et l'un est décédé [32]. Peu de temps après, une autre épidémie est survenue au début de l'année 1970 au Nigéria sur le plateau de Jos et 28 cas dont une quinzaine de morts ont été dénombrés [33-35].

En 1971, deux cas de fièvre de Lassa ont été importés en Grande Bretagne [36]. En juin, c'est une sœur travaillant à l'hôpital de Serabu en Sierra Leone qui s'est contaminée en se piquant avec l'aiguille d'une seringue ayant servi à prélever un patient fiévreux. En septembre, un médecin de l'hôpital de Segbwema est tombé malade. Ces deux patients souffraient alors de fièvre, douleurs, maux de tête, nausées, vomissements et furent rapatriés dans un hôpital de Londres. Ils guérirent par la suite. A cette époque, la maladie était inconnue, et seulement un an après la fièvre de Lassa était ainsi diagnostiquée par des tests de recherche d'anticorps sériques.

Entre 1970 et 1972, une épidémie s'est déclarée dans un village de la province Est de la Sierra Leone et s'est transmise dans les hôpitaux de la région [37, 38]. Le virus a été à l'origine de 63 cas avec plus de 25 morts. C'est au cours de cette épidémie que LASV a été isolé pour la première fois chez un rongeur de l'espèce *Mastomys natalensis* [39]. En mars et avril 1972, LASV a été à l'origine de 11 cas dont 3 décès dans un hôpital de la ville de Zorzor au Libéria [40]. Trois nouveaux cas ont été détectés en janvier et février 1974 à Onitsha dans l'état d'Anambra au Nigéria. Le premier patient était un jeune adulte nigérian et les deux autres des médecins allemands qui s'étaient infectés en soignant d'autres patients [41].

- *Réémergence de LASV : de nouvelles épidémies*

Grâce à l'amélioration des moyens de surveillance et de diagnostic, les cas de fièvre de Lassa sont détectés plus rapidement et plusieurs épidémies importantes ont ainsi été reportées dans les pays endémiques. La Sierra Leone a été particulièrement touchée de 1995 à 1997, entre 2003 et 2004 [42] et pendant l'année 2010. De même, des épidémies importantes sont survenues au Nigéria en 1989, entre 2004 et 2005 [43], entre 2008 et 2009 et plus récemment entre 2011 et 2012. Le tableau I retrace les cas d'infection par LASV lors des épidémies majeures.

Des symptômes similaires à ceux de la fièvre de Lassa ont été décrits bien avant 1969 et la découverte de LASV [44]. Entre octobre 1955 et octobre 1956, lors d'une épidémie à Segbwema en Sierra Leone, 45 cas d'une maladie ressemblant à la fièvre de Lassa ont été reportés avec 29% de mortalité. Un autre cas a été décrit chez un missionnaire travaillant au Nigéria en 1952 ayant guéri d'une maladie similaire à la fièvre de Lassa. La découverte de LASV un peu plus tard a probablement été permis par l'amélioration et la multiplication des structures de santé et des moyens de diagnostic. La modification de l'habitat des rongeurs transmettant le virus qui se sont multipliés et rapprochés des villages est probablement à l'origine de l'émergence de la fièvre de Lassa. Cette maladie est maintenant un problème important de santé publique dans les pays endémiques. Actuellement, on compte 100 à 300 000 cas par an et 5 à 6 000 morts. De nombreuses infections restent asymptomatiques et ne nécessitent aucune hospitalisation, elles ne sont alors même pas détectées.

- *Importation de LASV dans Les pays développés*

Plusieurs cas de fièvre de Lassa ont été importés dans les pays développés, en Europe, aux Etats-Unis, au Canada. De nombreuses mesures de surveillance et des procédures de confinement ont ainsi été mises en place. En février 1976, un cas a été importé de Sierra Leone aux Etats Unis [45]. Pour éviter la propagation d'une éventuelle épidémie, 552 personnes qui avaient côtoyé le patient avant la mise en place des procédures d'isolement ont été identifiées et surveillées. En décembre 1981, un nouveau cas de fièvre de Lassa a été diagnostiqué dans un hôpital de Londres. La patiente, originaire du Nigéria et en visite en Angleterre, a souffert de fièvre, maux de tête, nausées, vomissements et asthénie pendant plus de 30 jours et sa convalescence a duré plusieurs mois [46].

Tableau I. Epidémies de fièvre de Lassa dans les pays endémiques. D'après [44, 47, 48]. *Il faut noter que le nombre de cas confirmés est très inférieur au nombre réel de personnes touchées par le virus, à cause des nombreuses infections asymptomatiques non déclarées. Le taux de mortalité donné ci-dessous comporte donc un biais et est inférieur à 15% dans les pays endémiques.

Période	Région	Nombre de cas confirmés*	Taux de mortalité parmi les cas confirmés*
janvier-février 1969	Lassa et Jos, Nigéria	3	67%
janvier-février 1970	Jos et Vom, Nigéria	28	54%
1970-1972	Panguma et Tongo, Sierra Leone	63	38%
mars-avril 1972	Zorzor, Libéria	11	36%
janvier-février 1974	Onitsha, Nigéria	3	33%
janvier 1975	Zonkwa et Vom, Nigéria	4	?
1989	Nigéria	34	65%
1995	Kenema, Sierra Leone	167	36%
1996	Kenema, Sierra Leone	799	19%
janvier-avril 1997	Kenema, Sierra Leone	353	12%
juillet 2000	Sierra Leone	4	4 morts
nov. 2003-mars 2004	Centre de la Sierra Leone	80	10%
hiver 2004	Kenema, Sierra Leone	70-95	30-50% (<5 ans) 71% (<1 an)
2004	Etat Edo, Nigéria		22 morts
mars 2005	Etat Edo, Nigéria		10 morts
septembre 2006	Comté de Nimba, Libéria	10	50%
janv. 2008-fév. 2009	Nigéria	390	14%
début 2010	Etat Kebbi, Nigéria		17 morts
janv-octobre 2010	Nord de la Sierra Leone	153	31%
déc. -sept. 2011	Nigéria (23 états)	147	93 morts

Pendant l'année 2000, ce sont quatre cas fatals de fièvre de Lassa qui ont été importés en Europe. En janvier, une étudiante ayant séjourné en Côte d'Ivoire et voyagé au Ghana et au Burkina Faso est décédée de la fièvre de Lassa en Allemagne deux semaines après le début de la maladie [49]. Une nouvelle souche LASV a été isolée à partir de cette patiente: il s'agit de la souche AV, différente des souches du Nigéria, du Libéria et de Sierra Leone déjà connues [22]. En mars, un militaire anglais sévèrement malade de la fièvre de Lassa a été évacué de Sierra Leone et transféré dans un hôpital de Londres où il a succombé. En avril, un autre cas est importé du Nigéria vers l'Allemagne. Enfin, en juillet, un médecin néerlandais travaillant en Sierra Leone est retourné aux Pays Bas avec la fièvre de Lassa et a développé une encéphalopathie et des dysfonctionnements rénaux puis est décédé des suites d'une défaillance respiratoire.

Tableau II. Cas importés de fièvre de Lassa en dehors des pays endémiques. Burkina Faso (BF), Etats-Unis (E-U), Royaume Uni (RU), Sierra Leone (SL). D'après [44, 47, 48].

Année	Origine	Importation	Age	Sexe	Profession	Issue de la maladie
juin 1969	Nigéria	New Haven, E-U	58	?	Agent de laboratoire	Survie
1971	Serabu, SL	Liverpool, RU	?	F	Infirmière	Survie
1971	Segbwema, SL	Boston, RU	?	H	Médecin	Survie
1972	Panguma, SL	Londres, RU	35	F	Infirmière	Survie
1974	Nigéria	Allemagne	33	H	Médecin	Survie
1975	Nigéria	RU	39	H	Médecin	Mort le 8 ^{ème} jour
fév. 1975	SL	Washington, E-U	26	F	Bénévole	Survie mais surdité unilatérale
mars 1976	SL	Washington, E-U	43	F	Bénévole	Survie
1976	Nigéria	RU		H	Ingénieur	Survie
1980	Côte d'Ivoire	Pays Bas	34	H	Bénévole	Survie
déc. 1981	Jos, Nigéria	Londres, RU	18	F	Professeur	Survie
1982	Nigéria	RU	21	F	Diplomate	Survie
1984	SL	RU		H	Géologue	Survie
1985	SL	RU	27	F	Infirmière	Survie
1987	SL/Libéria	Israël	47	H	Ingénieur	Survie
1987	SL	Japon	48	H	Ingénieur	Survie
1989	Nigéria	Canada	38	H	Agriculteur	Survie
fév. 1989	Ekpoma, Nigéria	Chicago, E-U	43	H	Ingénieur	Mort le 14 ^{ème} jour
janv. 2000	Côte d'Ivoire/ BF/Ghana	Würzburg, Allemagne	22-23	F	Etudiante	Mort le 15 ^{ème} jour
mars 2000	Freetown, SL	Londres, RU	50	H	Bénévole	Mort le 30 ^{ème} jour
avril 2000	Nigéria	Allemagne	57	H		Mort le 16 ^{ème} jour
juillet 2000	SL	Leiden, Pays Bas	48	H	Médecin	Mort le 16 ^{ème} jour
2003	SL	RU		H	Militaire	Survie
août 2004	SL/Libéria	Trenton, E-U	38	H	Homme d'affaire	Mort le 7 ^{ème} jour environ
2005	Libéria	Pakistan			2 militaires	
juill. 2006	SL	Munster, All. via Bruxelles, Belg.	68	H	Touriste	Survie
janv. 2007	Taraba, Nigéria	Pretoria, Afrique du Sud	46	H	Médecin	Survie
janv. 2009	Anambra, Nigéria	Londres, RU	66	H		Mort le 23 ^{ème} jour
fév. 2009	Mali	Londres, RU	≈ 20	H		Mort le 11 ^{ème} jour
janv. 2010	Nimba, Libéria	Pennsylvanie, E-U	47	H		Survie
2010	SL	E-U			Touriste	
mars 2011	Afrique de l'ouest	Linköping, Suède	≈ 30	F	Humanitaire	Survie

En février 2009, un homme d'une vingtaine d'année contaminé dans un pays situé en dehors de la zone d'endémie connue [50] a été rapatrié à Londres. Il avait travaillé pendant plusieurs semaines dans des zones rurales au sud du Mali proche de la frontière avec la Côte d'Ivoire. Plus tard, des analyses ont confirmé la circulation de LASV chez les rongeurs au Mali [51].

Depuis 1969, on a dénombré 20 cas de fièvre de Lassa importés en Europe, huit aux Etats Unis et Canada, un au Japon, un en Israël, deux au Pakistan et un en Afrique du Sud d'après les rapports de santé du CDC, de l'Organisation Mondiale de la Santé et du programme de surveillance des maladies émergentes proMED. Elles sont reportées dans le tableau II.

Transmission et propagation de LASV

Dès les premiers cas, il est apparu que la transmission interhumaine de LASV se faisait par des lésions cutanées, le sang et les fluides corporels ou de façon nosocomiale pour un tiers des infections [30]. La contamination interhumaine par aérosols n'a jamais été démontrée. D'ailleurs, certains travaux ont montré que LASV était peu stable à l'air (demi-vie entre 10 min et presque 1 heure à 24 et 32°C) [52]. De très nombreuses infections par LASV sont contractées dans les hôpitaux par les médecins et personnels de santé. Dans les pays endémiques, les conditions rudimentaires des structures de santé ne permettent pas toujours la mise en œuvre de moyens pour la protection du personnel médical [53]. Les infections fatales touchent indifféremment des personnes de tout âge et des deux sexes. Le taux de mortalité est cependant plus important chez les femmes enceintes surtout pendant le 1^{er} trimestre [54].

Le réservoir animal de LASV a été découvert suite aux épidémies de 1970-72 en Sierra Leone [39]. Il s'agit d'un petit rongeur péri-domestique de l'espèce *Mastomys natalensis* vivant dans les champs cultivés et près des habitations, et qui constituent plus de la moitié des rongeurs capturés près des lieux de vie des villageois [55]. Les hommes se contaminent par morsures, inhalation des excréta des rongeurs ou consommation d'aliments contaminés par les excréta ou l'urine des rongeurs. La chasse puis la consommation des rongeurs sont également une voie de contamination par LASV [56] et il a été montré que dans les zones où les rongeurs sont consommés comme source de protéine, il existait une forte séroprévalence de fièvre de Lassa.

Des études se sont attachées à comprendre les facteurs géographiques, environnementaux, écologiques et humains responsables de la contamination par les rongeurs. Certaines ont reporté que le nombre d'infections par LASV était deux à trois fois plus important pendant la saison des pluies que lors de la saison sèche. Cette observation s'explique en partie par les mouvements migratoires des *Mastomys* selon les saisons [57]. Les pluies et dans une moindre mesure la

température paraissent être des facteurs déterminants à l'inverse de l'altitude ou de la végétation. Les zones à risque pour la fièvre de Lassa couvrent 80% de la Sierra Leone et du Liberia, 50% de la Guinée, 40% du Nigeria, 30% de la Côte d'Ivoire, du Togo et du Benin, et 10% du Ghana [58]. Des études ont aussi montré que, pendant les périodes de guerre civile, l'incidence des infections par LASV s'accroît. Ainsi, la destruction de l'habitat des rongeurs suite aux mouvements de masse des populations dans les zones de conflits, les mauvaises conditions sanitaires dans les camps de réfugiés mais également la prédation des rongeurs pour se nourrir [59] sont des facteurs humains à l'origine de l'augmentation des rencontres des hommes avec les rongeurs et donc du risque d'infection par LASV.

Séroprévalence

Suite aux nombreuses épidémies et aux cas d'importation, plusieurs études ont été menées pour rechercher la présence d'anticorps anti-LASV dans les populations et les rongeurs réservoirs du virus des pays endémiques et avoisinants [37, 40, 41, 58, 60]. Elles ont démontré que LASV circulait également en Guinée et au Sénégal [61].

En Sierra Leone, la séroprévalence est ainsi évaluée entre 8 à 52% [55]. En Guinée, la plus forte séroprévalence (25-55%) a été détectée chez les habitants des zones de forêt tropicale et de savane ainsi que dans les zones frontalières avec la Sierra Leone et le Libéria [62]. Une étude a montré également que des patients ayant séjourné au Burkina Faso, au Mali, en Côte d'Ivoire ou en République Centrafricaine/Congo présentaient des anticorps anti-LASV. Elle suggère que LASV pourrait circuler aussi dans ces pays. A l'opposé, LASV ne circule ni au Gabon, ni en Afrique de l'est (Kenya), ni à Madagascar [63, 64] de par l'absence d'anticorps anti-LASV chez l'homme et les primates non humains (PNH) originaires de ces pays. La séroprévalence est aussi très faible dans les pays d'Afrique centrale (Cameroun, République centrafricaine, Tchad, Congo, Guinée équatorienne) [65].

Diagnostic

Au début de la maladie, un patient atteint de fièvre de Lassa ne présente pas de signe spécifique et il est très difficile d'établir un diagnostic. Il y a des risques de confusion avec d'autres maladies telles que gastroentérites, pneumonies, paludisme, shigellose, fièvre typhoïde, leptospirose, hépatites virales ou autres arboviroses qui sont également présentes dans les pays endémiques.

Actuellement, il existe de nombreuses techniques permettant de diagnostiquer les FH virales [66]. Le virus peut être isolé dans des cultures cellulaires ou des animaux. Il peut être détecté par les

antigènes, par immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre le virus ou par microscopie électronique, et par le matériel génétique, par RT-PCR. Chez les malades, la présence du virus peut aussi être mise en évidence indirectement par la détection des anticorps dans le sérum.

⇒ *Culture du virus et détection des antigènes*

LASV peut être isolé à partir du sérum et de fluides corporels de patients, sur des cellules Véro qui permettent une réplication virale efficace. Cette technique est longue et nécessite de travailler en laboratoire P₄, mais elle permet de caractériser en détail la souche du virus isolé. Elle n'est pas utilisée en diagnostic précoce dans les pays endémiques.

Lors de l'infection de patients par LASV, la virémie est élevée et les antigènes viraux sont ainsi facilement détectables avec des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines du virus par une technique appelée capture d'antigène ou directement par immunohistochimie sur des tissus.

⇒ *Sérologie*

Afin de détecter les anticorps IgM et IgG dans le sang des patients, des tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilisant des protéines recombinantes ou des cellules infectées comme antigène ont été développés [67, 68]. Cette technique présente l'avantage d'être rapide mais également quelques difficultés. Les IgM ne sont pas détectables au tout début de la maladie et la présence d'IgG n'est pas corrélée à la phase aiguë car les habitants des régions endémiques ont souvent de forts taux d'anticorps sans présenter aucun symptôme. De plus, il arrive que les anticorps détectés réagissent de façon croisée avec les antigènes LASV mais soient apparus lors d'infection par d'autres virus.

⇒ *RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)*

Le matériel génétique viral est isolé à partir du sérum ou plasma des patients. LASV peut aussi être détecté dans le liquide des lavages de la gorge et dans les urines des patients convalescents [38, 69]. Le liquide céphalorachidien est rarement utilisé car LASV n'est présent qu'exceptionnellement dans le système nerveux central (SNC) [70].

Cette technique nécessite l'extraction des ARN viraux, puis une étape de transcription inverse (RT) et les ADN complémentaires (ADNc) ainsi obtenus sont ensuite amplifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Les deux étapes RT et PCR peuvent être réalisées en une seule fois (RT-PCR *one-step*) afin de gagner en temps et en sensibilité. La conception des amorces est une étape difficile à cause de la variabilité génétique des souches de LASV. Les échanges de nucléotides réduisent l'efficacité de la PCR. Ainsi, les amorces doivent cibler les régions qui sont fortement conservées

pour toutes les souches LASV comme les extrémités 5' et 3' des segments S et L [71]. Des techniques de RT-PCR permettant d'amplifier une partie ou la totalité du segment S ont été mises au point en premier lieu. Une méthode de RT-PCR qui permet de détecter tous les arénavirus de l'ancien monde a été développée en utilisant des amorces basées sur les séquences conservées du segment L.

La sensibilité et la spécificité de la PCR conventionnelle peuvent être améliorées par d'autres techniques comme la « *nested-PCR* », le « *Southern blotting* » et la PCR en temps réel [72]. Les deux premières méthodes sont peu utilisées pour le diagnostic de la fièvre de Lassa car elles sont longues et présentent des risques de contamination par des ADN lors des différentes étapes. La PCR en temps réel a de nombreux avantages. Elle est rapide et permet de quantifier les ARN viraux, d'augmenter la spécificité grâce à l'utilisation des sondes spécifiques en plus des primers et de diminuer les risques de contamination des échantillons. Le développement d'une technique de diagnostic de LASV par PCR en temps réel est cependant très difficile à réaliser, due en partie à la variabilité génétique des souches virales.

En pratique, plusieurs techniques sont utilisées en parallèle afin d'aboutir à un diagnostic fiable.

Signes cliniques et physiopathogénèse

Dès les premières épidémies, des études sur le terrain ont permis de décrire la pathologie de la fièvre de Lassa. Les consultations des patients ont caractérisé les signes cliniques. Des observations macroscopiques et microscopiques ont ensuite été effectuées à partir des organes obtenus lors d'autopsies de patients décédés pour préciser les atteintes tissulaires. Des prélèvements sanguins ont enfin permis l'analyse des fonctions hématologiques et des médiateurs chimiques tout au long de la maladie [30, 38, 73].

La période d'incubation de la maladie est de l'ordre de 7 à 17 jours. Pendant la première semaine suivant l'infection, les symptômes qui apparaissent ne sont pas spécifiques mais plutôt de type grippaux. Les patients souffrent de fièvre, asthénie, céphalées, arthralgie et myalgie. Ensuite, d'autres signes tels que myosite, pharyngite ulcéralive, nausées, vomissements, diarrhées, toux, douleurs abdominales et thoraciques apparaissent. Ces symptômes disparaissent le plus souvent dans les 10 à 15 jours et la grande majorité des patients survit. Les cas les plus sévères sont associés à des œdèmes, une atteinte hépatique et rénale, hémorragies, myocardite, pneumopathie et pleurésie, et quelquefois les malades présentent une encéphalopathie. La mort survient dans un contexte de défaillance multisystémique et de choc hypoxique, hypovolémique et hypotensif mais les causes ne sont pas clairement établies.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages présentes dans la peau et les muqueuses sont les premières cellules cibles de LASV [74, 75]. Elles répliquent fortement le virus et permettent ainsi, la dissémination dans tout l'organisme. L'infection se propage ensuite aux hépatocytes, fibroblastes et cellules endothéliales. Une forte virémie est ensuite détectée entre autres dans le foie, les poumons, la rate, les reins, le cœur, le placenta et les glandes mammaires.

Des autopsies de patients décédés et des examens post-mortem d'organes ont permis de caractériser les atteintes au niveau histologique [76, 77]. Les lésions les plus communément observées sont des nécroses hépatocellulaires, surrénales et spléniques. Un peu moins fréquemment des signes de myocardite et de pneumonie interstitielle sont observés ainsi que des lésions au niveau des tubules rénaux mais aucune au niveau du SNC.

Les prélèvements sanguins sur des patients infectés par LASV ont montré une élévation des enzymes hépatiques (aspartate aminotransférase (AST) et alanine aminotransférase (ALT)), de la créatine phosphokinase et de l'azote uréique sérique. De plus, de fort taux d'IL-8 et CXCL10 (IP-10) ont été mesurés dans le sang des malades ayant survécu alors que ces médiateurs étaient peu ou pas détectés dans les cas fatals de fièvre de Lassa [78]. Ainsi, l'analyse des taux d'AST/ALT, d'IL-8 et de CXCL10 dans le sang des malades peut permettre de pronostiquer l'issue de la maladie.

⇒ *Atteintes hépatiques*

Les lésions les plus communes et les plus importantes sont celles présentes au niveau du foie. Elles sont caractérisées par des nécroses hépatocellulaires multifocales, une dégénérescence cytoplasmique focale des hépatocytes, des mitoses hépatocellulaires, et l'infiltration de lymphocytes et cellules mononucléées phagocytaires au niveau des foyers nécrotiques et mitotiques. Les altérations du foie varient beaucoup chez les malades qui décèdent mais les études post-mortem ont permis de classer les patients en trois catégories qui pourraient correspondre à trois phases chronologiques de l'hépatite lors de la fièvre de Lassa. La première phase constitue l'étape tardive de la dissémination de LASV au foie. Elle est caractérisée par des lésions hépatocellulaires actives avec moins de 20% d'hépatocytes nécrotiques et sans infiltration de cellules immunitaires. La deuxième phase constitue le pic de l'hépatite avec une propagation de la dégénérescence cytoplasmique focale. Entre 20 et 50% de foyers hépatocellulaires nécrotiques et une infiltration limitée de phagocytes sont observés. Cette phase est caractérisée par la propagation des lésions hépatocellulaires mais également par la régénération cellulaire qui intervient à la suite de l'élimination des cellules nécrotiques par les phagocytes. La troisième phase est définie par l'absence de dégénérescence cytoplasmique focale et par la présence de mitoses

hépatocellulaires. Moins de 10% des hépatocytes sont en nécrose et cette phase constitue la régénération du foie. Ces observations montrent que des phases de lésions cellulaires, de nécroses et de régénérations se succèdent lors de l'infection par LASV. Elles sont cependant toutes observées lors de l'examen post mortem du foie [79] et donc présentes lors de la mort. De plus, il existe probablement des dommages tissulaires autres que dans le foie comme en témoigne l'élévation du ratio AST/ALT observé lors de la fièvre de Lassa. En effet, les taux d'AST et d'ALT ne sont pas toujours corrélés au degré des altérations hépatiques. En effet, l'élévation du ratio AST/ALT observé lors de la fièvre de Lassa est inverse à celui noté lors des hépatites et est en faveur d'une origine extrahépatique [79].

⇒ *Atteintes de l'endothélium vasculaire et coagulopathie*

Les fonctions hématologiques sont affectées lors de l'infection par LASV. Les signes hémorragiques caractérisés par des pétéchies, des œdèmes cutanéomuqueux et des épanchements de liquides au niveau des tissus et organes sont observés à différents degrés chez les patients et leur sévérité est souvent corrélée avec une issue fatale de la maladie. L'augmentation de la perméabilité vasculaire peut expliquer en partie la fuite de liquide mais très peu de lésions vasculaires sont notées.

Afin d'expliquer les signes hémorragiques, des études se sont attachées à évaluer les troubles de la coagulation. Contrairement aux FH induites par les Filovirus, la fièvre de Lassa n'est pas associée à des dysfonctionnements massifs de la cascade de coagulation. En effet, les malades ne présentent pas de phénomène de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) caractérisée par des dépôts de fibrine localisés de façon diffuse dans l'organisme. Le taux des produits de dégradation du fibrinogène est également constant. Une thrombocytopénie modérée et des défauts d'agrégation plaquettaire sont tout de même notés chez les cas plus sévères alors que le nombre de plaquettes reste constant chez les survivants. La plupart des patients montrant des signes hémorragiques présentent des défauts d'agrégation plaquettaire. Un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes a été mis en évidence chez les patients infectés par LASV et son taux dans le plasma est fortement corrélé à l'occurrence des hémorragies et la sévérité de la maladie [80].

Cependant, les hémorragies externes et internes, les atteintes des fonctions hématologiques et les défauts de coagulation ne suffisent pas à expliquer le choc terminal et la mort.

⇒ *Réaction immunitaire*

Les étapes précoces de la fièvre de Lassa sont caractérisées par une lymphopénie transitoire affectant les lymphocytes T, B, et les cellules NK suivie d'une neutrophilie [81]. Les cellules sont

déplétées des ganglions lymphatiques et de la rate. Les études dans des modèles *in vitro* ont également suggéré que LASV induisait une immunosuppression. En effet, les CPA infectées ne sont pas activées et ni en mesure d'initier le développement d'une réponse immunitaire efficace. De même, l'absence d'IL-8 et de CXCL10 semble être corrélée à l'issue fatale de la maladie. Ainsi, l'immunosuppression induite par LASV pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la maladie. Les mécanismes immunitaires développés lors de la fièvre de Lassa seront détaillés dans la partie suivante.

⇒ *Convalescence*

Chez 30% des patients survivants, l'apparition d'une surdité uni ou bilatérale temporaire ou définitive apparaît pendant la phase de convalescence lors de l'élimination du virus mais elle peut également survenir pendant la phase aigüe de la maladie [82]. Les causes demeurent encore inconnues. Les Arénavirus non cytopathiques, et donc probablement LASV, inhibent la myélinisation des cellules de Schwann, ralentissant ainsi la conduction des influx nerveux et donc les fonctions auditives [83]. Cependant, il semblerait que la virémie ne soit pas responsable de l'apparition de la surdité et un effet délétère des réponses immunitaires dans l'oreille interne serait plus vraisemblablement en cause [84].

Modèles animaux d'étude de la fièvre de Lassa

Les modèles animaux ont permis de mieux caractériser la physiopathogenèse de la fièvre de Lassa.

- *Rongeurs*

Le réservoir de LASV est un rongeur, il n'est donc pas pathogène pour son hôte. La pathologie induite par les souches sauvages de LASV ne peut donc pas être étudiée en utilisant les rongeurs. En effet, il est difficile d'adapter le virus aux rongeurs pour le rendre pathogène et reproduire ainsi les signes cliniques observés chez l'homme.

Des travaux de PB. Jahrling ont permis de reproduire la pathologie de la fièvre de Lassa en adaptant un Arénavirus du nouveau monde, le virus Pichinde (PICV), à la souche S₁₃ du cobaye [85]. PICV se réplique fortement dans les tissus viscéraux, la rate, les ganglions lymphatiques, les glandes salivaires, les poumons mais pas dans le cerveau. La virémie est modérée dans le foie, les glandes surrénales, les reins, le pancréas et le cœur. Tous les animaux infectés dans cette étude souffraient d'une lymphopénie, d'une pneumonie interstitielle, avaient des signes de nécroses hépatocellulaires et spléniques ainsi que des taux élevés d'AST et ALT sériques et n'ont pas survécu à l'infection. Aucune cellule inflammatoire n'a été observée au niveau des lésions. Des anticorps neutralisants

ont été développés uniquement chez les survivants tardivement pendant la convalescence. Le cobaye S13 est également susceptible à la souche LASV-Josiah et il développe une pathologie ressemblant à la fièvre de Lassa. Cependant, des infiltrats inflammatoires apparaissent chez le cobaye suite à l'infection ce qui n'est pas le cas chez l'homme ou le PNH [86, 87].

Le hamster infecté par le virus Pirital, un Arénavirus du nouveau monde, développe une pathologie similaire à la fièvre de Lassa. Les animaux infectés développent une forte virémie. Une leucocytose, une coagulopathie, des hémorragies et œdèmes pulmonaires, des nécroses dans le foie et la rate et l'élévation des taux de transaminases sériques est également observée [88].

Les souris de laboratoire développent des encéphalopathies aiguës lors de l'infection par LASV par voie intracérébrale mais elles demeurent résistantes à l'infection systémique par LASV, éliminent rapidement le virus et ne reproduisent pas la physiopathologie caractéristique de la fièvre de Lassa. Cependant, des données récentes ont été obtenues par l'étude de souris HHD possédant une molécule HLA (*human leucocyte antigen*)-A2.1 chimérique humaine/murine à la place de celle du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I murin [89]. Ces souris sont virémiques pendant une longue période et développent une maladie sévère. Ce modèle permet d'étudier l'implication des populations immunitaires dans le contrôle de l'infection par LASV. Ces résultats restent cependant discutables et sont à confirmer chez l'homme ou dans un autre modèle animal.

L'infection par LASV a également été étudiée chez des souris IFNAR^{-/-} (qui n'expriment pas le récepteur des IFN de type I IFNAR) et IFNa/bgR^{-/-} (qui n'expriment ni IFNAR, ni le récepteur de l'IFN- γ) [90]. Une infection persistante a été observée, associée avec une perte de poids modérée chez tous ces animaux. LASV s'est répliqué dans le cerveau, la rate, les reins, le foie, les poumons et le cœur. L'infection par LASV n'est cependant pas létale dans ces modèles contrairement à l'infection par JUNV [91], et ne permettent pas d'analyser les mécanismes de physiopathogénèse.

Les rongeurs sont souvent moins sensibles aux infections virales que les PNH et ils contrôlent l'infection grâce à une forte réponse IFN de type I. En effet, les populations lymphocytaires et les régions génétiques contrôlant les réponses immunes innées sont différentes entre les rongeurs et les PNH et pourraient être impliquées dans le contrôle des infections virales [92]. Ainsi, malgré certaines similitudes dans la pathologie développée, le rongeur ne constitue pas le meilleur modèle pour étudier la pathogénèse de la fièvre de Lassa, analyser les réponses immunitaires induites et comprendre les causes de la mort.

- *Primates non humains*

Dans la nature, les PNH peuvent développer une FH lorsqu'ils sont infectés par le virus de la FH simienne, un Artérovirus. La pathologie observé peut être comparée à la fièvre de Lassa et aux autres FH virales [93]. Certains symptômes comme la coagulopathie, l'élévation des taux d'enzymes hépatiques et l'immunosuppression sont ainsi similaires à ceux apparaissant chez l'homme lors de la fièvre de Lassa et d'autres FH virales.

Les PNH sont les animaux qui présentent la plus étroite proximité phylogénétique et de nombreuses similitudes physiologiques, immunologiques avec l'homme. Ainsi, ils constituent un modèle qui permet de caractériser la pathologie de la fièvre de Lassa et tester des antiviraux et vaccins. Les plus utilisés sont le singe écureuil (*Saimiri sciureus*), le marmouset commun (*Callithrix jacchus*), le singe rhésus (*Macaca mulatta*) et le singe cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

⇒ *Chez Le singe écureuil et Le marmouset*

Très tôt, des études de la pathogenèse de la fièvre de Lassa sur des singes écureuils ont été conduites [94]. La période d'incubation chez ces animaux a été évaluée entre 8 et 18 jours. Le virus semble atteindre en premier lieu les ganglions lymphatiques, le foie et les reins puis le reste des organes. Lors des observations histopathologiques, des nécroses ont été notées dans la rate et les ganglions lymphatiques, des lésions au niveau du myocarde et des artères.

La pathologie de la fièvre de Lassa a également été analysée chez les marmousets [95]. Ces animaux présentent de la fièvre, une perte de poids, une virémie élevée, de fort taux d'enzymes hépatiques et ils décèdent entre 15 et 20 jours après l'infection. Comme chez l'homme, des nécroses hépatiques multifocales avec une infiltration mineure de cellules inflammatoires sont observées ainsi qu'une néphrite interstitielle. Des phénomènes de régénération des hépatocytes, de déplétion lymphocytaire et d'immunosuppression des CPA apparaissent de façon similaire à la fièvre de Lassa chez l'homme.

⇒ *Chez Les singes rhésus et cynomolgus*

Afin de décrire au mieux la pathogenèse de la fièvre de Lassa, les études se sont basées sur les observations faites lors de l'infection de macaques par LASV [52, 96-103].

Chez le PNH, la FH est caractérisée par une forte virémie (supérieure à 10^5 focus-forming units (FFU) par ml de plasma), une atteinte du foie avec l'élévation des enzymes AST/ALT, une augmentation de la perméabilité vasculaire, des malaises, une détresse respiratoire, une déshydratation, la perte de poids, une élévation de la température corporelle qui diminue brusquement juste avant la mort.

Les animaux infectés par LASV présentent des signes de léthargie et de dépression, de fièvre, d'aphagie, de constipation et de perte de poids, accompagnés de conjonctivites, de pétéchies et d'un syndrome respiratoire aiguë. Lors de l'autopsie, des atteintes pulmonaires, cardiaques, hépatiques, intestinales, spléniques, rénales, urologiques et des ganglions lymphatiques, des glandes surrénales, de l'endothélium et du SNC sont observées. Des effusions pleurales, des œdèmes péricardiques et quelques hémorragies viscérales sont également notées. Les lésions microscopiques majeures sont des nécroses hépatiques et une pneumonie interstitielle. Les animaux survivants ont une charge virale faible et peu de lésions. Ces études ont révélé également la présence d'une lymphadénopathie, d'une splénomégalie et des infiltrations de cellules mononucléées, associées à une destruction de l'architecture folliculaire et une déplétion cellulaire au niveau de la moelle osseuse, de la rate et des ganglions lymphatiques. Une thrombocytopénie et une lymphopénie caractérisent également l'infection des macaques par LASV. Tous les changements morphologiques et anatomiques observés ne suffisent pas à expliquer la mort.

Comme chez l'homme, il n'y a pas de CIVD chez le singe rhésus et cynomolgus infecté par LASV, le taux de plaquettes et de fibrinogène dans le sang reste constant et seul le taux de fibronectine est réduit lors de l'infection par LASV [104]. Le défaut d'agrégation plaquettaire peut en partie expliquer les effusions et les hémorragies observées. De plus, une réduction du volume intravasculaire due aux dysfonctionnements des cellules endothéliales est notée et elle pourrait, avec la coagulopathie, contribuer à la mort [102].

Beaucoup de corrélations entre la pathogénèse observée chez le singe et chez l'homme ont ainsi été observées et le PNH semble constituer un bon modèle d'étude de la fièvre de Lassa. En effet, les titres viraux et les lésions observés sont similaires dans beaucoup d'organes incluant foie, rate, poumons, reins, glandes surrénales, cœur et ovaires.

⇒ *Infection de macaques par LCMV-WE*

LCMV est un Arénavirus de l'ancien monde proche de LASV. La plupart des infections par LCMV passent inaperçues ou ne mènent qu'à de simples symptômes grippaux mais dans certains cas, l'infection peut avoir des conséquences dramatiques et l'immunodépression favorise la gravité de l'issue de la maladie. Les infections congénitales lors du troisième semestre de grossesse peuvent mener à une des atteintes cérébrales graves et irréversibles, une chorioretinite et des retards mentaux chez le fœtus. La transplantation d'organes infectés chez des patients peut également conduire à une infection létale [92].

L'infection de souris par LCMV est asymptomatique bien que les animaux soient virémiques et ce modèle est classiquement utilisé pour étudier la persistance virale, la tolérance et l'immunopathogénèse. L'infection intraveineuse de macaques par la souche virulente WE de LCMV a été présentée comme pouvant servir de modèle de la fièvre de Lassa. Elle peut être comparée à l'infection par la souche atténuée Armstrong de LCMV. LCMV-Armstrong est neurotropic chez la souris mais pas chez le PNH alors que l'infection par LCMV-WE, viscérotrope chez la souris, est plus souvent associée à des méningites aseptiques chez le singe.

Lors de l'infection par LCMV-WE par voie intraveineuse, les macaques deviennent virémiques 4 à 6 jours après l'infection, les signes cliniques de la maladie apparaissent en une semaine et les animaux décèdent entre 10 et 14 jours après l'infection [105, 106]. En premier lieu, les animaux montrent des signes de déshydratation et détresse respiratoire. L'infection est également caractérisée par la présence d'érythèmes cutanés, d'œdèmes sous-muqueux et pulmonaires et de foyers nécrotiques dans la cavité buccale. Des pétéchies et des saignements occasionnels des organes et des muqueuses montrent des fuites de sang au niveau des capillaires. L'histologie révèle des déplétions cellulaires dans la moelle osseuse, le thymus et dans d'autres organes lymphoïdes. Les macaques infectés par LCMV-WE souffrent d'une thrombocytopenie sévère, plus importante que celle observée lors de la fièvre de Lassa, et qui semble être due à la diminution de la production des mégacaryocytes dans la moelle osseuse. Une réduction des taux de plaquettes dans le sang apparaît suite à l'infection expliquant ainsi une faible coagulation et des défauts de réparation des vaisseaux. Des dosages dans le sang montrent des taux élevés des enzymes AST/ALT et d'IL-6 [107] de façon similaire à l'infection des singes par LASV. Le foie est aussi particulièrement atteint avec des nécroses cellulaires hépatiques associées à des infiltrats inflammatoires mineurs [108]. L'analyse du transcriptome dans le foie montre que l'infection par LCMV-WE affecte les gènes impliqués dans la production de l'énergie, le métabolisme des acides gras et du glucose [109]. Enfin, les pathologies du SNC sont rares chez les PNH infectés par LCMV-WE comme lors de la fièvre de Lassa [105]. De même, l'infection des PNH par LCMV-WE n'induit pas d'inflammation des tissus et donc pas d'infiltration de leucocytes polynucléaires. Au contraire, ces signes sont visibles chez le cobaye infecté par LCMV-WE et ils sont responsables de l'initiation des réponses antivirales puis également de la destruction massive des tissus. Chez le macaque infecté par LCMV-WE comme lors de la fièvre de Lassa, la mort semble être le résultat de défaillance des systèmes vasculaires et circulatoires et d'atteintes multi-organiques. Les atteintes hépatiques ainsi que la thrombocytopenie apparaissent cependant plus sévères lors de l'infection par LCMV-WE que par LASV.

L'infection de PNH par LCMV constitue un modèle intéressant puisqu'il permet de comparer les différences de pathogénicité des deux souches WE et Armstrong et de déterminer les facteurs de

virulence dans un modèle animal proche de l'homme. De plus, il ne nécessite plus de travailler en laboratoire P₄ et les analyses peuvent être effectuées plus rapidement et simplement en laboratoire P₃. Cependant, due aux quelques différences de pathologie observées, il est nécessaire de valider les données obtenues avec ce modèle directement chez des patients ou chez le PNH infecté par LASV afin de caractériser de façon précise la physiopathologie de la fièvre de Lassa.

Aspects moléculaires

- *Morphologie*

A la suite des premiers cas de fièvre de Lassa, les travaux ont permis d'isoler le virus, de l'identifier et de le caractériser au niveau moléculaire.

LASV appartient aux Arénavirus de l'ancien monde tout comme LCMV. Le groupe Arénavirus proposé initialement par E. Borden a été accepté par le Comité International de Taxonomie des Virus dès 1971. Ce nom, du latin *arenosus* qui signifie « sable », vient de l'observation en microscopie électronique de fins granules opaques de 20 à 25 nm présents à l'intérieur des virions, semblables aux grains de sable et correspondant aux ribosomes [110].

Les Arénavirus sont caractérisés par des particules virales de forme ronde, ovale ou pléomorphe d'un diamètre variant de 50 à 300 nm (110-130 nm en moyenne) qui possèdent des projections d'une dizaine de nm à la surface de l'enveloppe. Les ribosomes sont reliés par des filaments et arrangés en forme circulaire sous l'enveloppe virale. Les particules virales bourgeonnent à la surface des cellules infectées [111, 112]. Des photographies des particules virales sont présentées sur la figure 4.

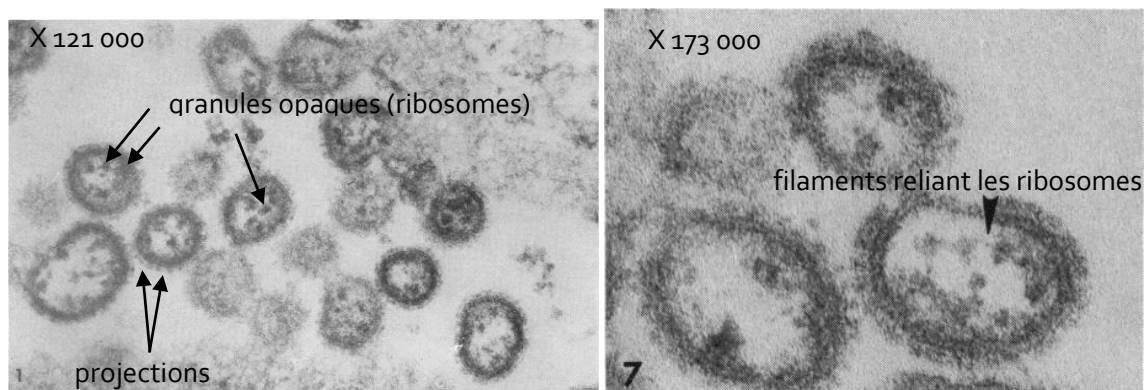


Figure 4. Observations de LASV dans des cultures de cellules Vero. Photographies obtenues par microscopie électronique sur des sections ultrafines. Tiré de [112].

Dès 1970, des tests d'incorporation de 5-bromodéoxyuridine (BrdU) suggèrent que le génome de LASV est vraisemblablement constitué d'acides ribonucléiques. De plus, les particules virales sont sensibles au détergent sodium deoxycholate, démontrant qu'elles sont enveloppées d'une membrane lipidique [31].

- **Organisation du génome**

Le génome de LASV et des autres Arénavirus comprend deux segments d'ARN simple brin de polarité négative : un segment L pour « *large* » de 7200 nucléotides et un segment S pour « *small* » de 3400 nucléotides [113]. Le segment S est le plus abondant dans les particules virales. Comme les autres virus à ARN simple brin de polarité négative, LASV possède une ARN polymérase ARN dépendante mais la stratégie de codage utilisée par LASV est totalement différente. Cette dernière est appelée ambisens car chaque segment contient deux gènes en orientation opposée. Le segment S code le précurseur de la glycoprotéine (GPC) ainsi que la nucléoprotéine (NP). Le segment L code une petite protéine de matrice Z et l'ARN polymérase ARN-dépendante L. Des petites régions intergéniques non codantes séparent la GPC de la NP sur le segment S et la Z de la L sur le segment L en formant des structures secondaires en épingle à cheveux [114, 115]. L'organisation des virions et du génome viral est présentée dans la figure 5.

L'ARN viral s'associe avec les protéines NP et L pour former le complexe ribonucléoprotéique (RNP). Les deux protéines NP et L sont les facteurs *trans* minimums requis pour la transcription et la réplication virale. De la même façon, les régions non codantes situées aux extrémités des segments ainsi que la région intergénique constituent les séquences *cis* requises pour ces étapes.

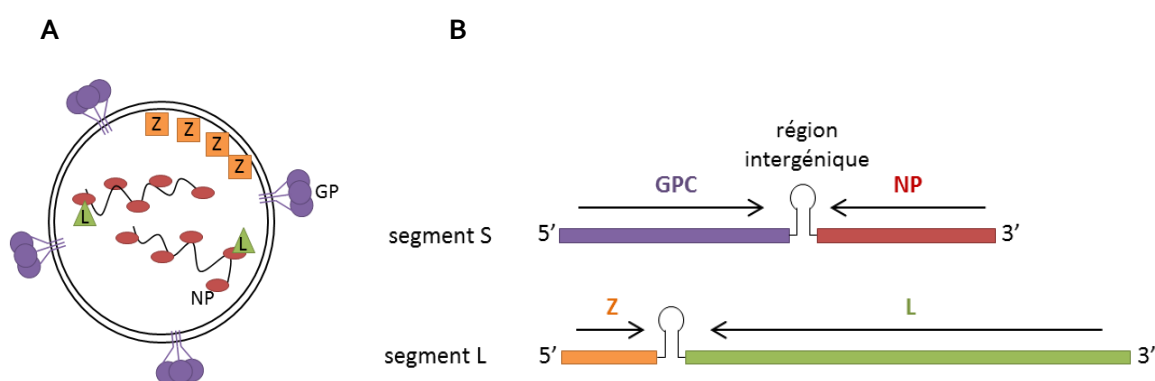


Figure 5. Organisation des particules (A) et du génome (B) des Arénavirus. D'après [1].

Les régions non codantes à chaque extrémité 5' et 3' des segments contiennent des séquences de 19 nucléotides qui constituent les promoteurs des gènes. Ces séquences sont complémentaires entre

elles et sont fortement conservées entre les segments S et L du virus et également entre les Arénavirus. Les promoteurs sont constitués d'une région conservée des nucléotides 1 à 12 qui interagit avec le complexe de réplication et d'une région variable de 13 à 19. Les séquences en 5' et en 3' sont toutes les deux nécessaires pour activer la transcription. Les promoteurs fonctionnent ainsi en duplex et régulent la transcription et réplication d'une manière coordonnée [116].

Les régions intergéniques forment des structures secondaires stables en épingles à cheveux et semblent participer à la régulation de l'étape de terminaison de la transcription. La région intergénique du segment S de LASV forme une seule épingle à cheveux.

- *Les protéines virales*

LASV a été purifié pour identifier les protéines structurales et les comparer avec les complexes protéiques déjà isolés pour d'autres Arénavirus (Tacaribe, PICV, LCMV). Les premières expériences avec du sérum anti-LASV révèlent l'existence des protéines NP, GP1, GP2 et GPC. D'autres études ont montré par la suite que la GPC est le précurseur des GP1 et GP2. Le génome viral code trois protéines structurales NP, GPC et Z et une protéine non structurale, la polymérase L.

- *La nucléoprotéine*

La NP de LASV est une protéine de 569 acides aminés. C'est la protéine structurale la plus abondante dans les virions. Elle peut être phosphorylée aux stades tardifs de l'infection virale et bien qu'elle possède des sites de N-glycosylation, elle n'est pas glycosylée. Sa fonction principale est de protéger l'ARN viral lors de l'infection mais un autre rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire a émergé récemment. Un schéma représentant les domaines structuraux et les fonctions de la NP est présenté sur la figure 6.

- ⇒ *Le complexe RNP et La transcription/réplication*

La NP s'associe avec l'ARN viral génomique et la polymérase L pour former le complexe RNP. C'est l'unité infectieuse minimale, essentielle pour la transcription et réplication virale. Au sein de ce complexe RNP, les NP peuvent aussi s'associer entre elles par le domaine N-terminal lorsqu'un ARN simple brin est présent [117]. La cristallisation de la NP associé à l'ARN a montré que l'ARN se lie dans une cavité profonde qui possède des résidus basiques et se forme dans le domaine N-terminal. Ces données suggèrent que la NP s'ouvrirait pour accepter l'ARN [118]. La NP peut également se lier à la coiffe des ARNm [119].

La NP joue un rôle important dans la régulation de la transcription et de la réplication. Le domaine C-terminal de la NP et le résidu Isoleucine 53 sont cruciaux pour la fonction de la polymérase L lors de la transcription et de la réplication virale.

Les complexes RNP sont ensuite incorporés dans les particules virales grâce à l'interaction de la NP avec la protéine Z qui fait le lien avec la membrane plasmique. La région C-terminale de la NP est primordiale dans l'interaction avec la Z et elle contient des résidus essentiels pour son incorporation dans les pseudo-particules ou VLP (*Virus-like particles*) [120]. De plus, la NP semble contenir un domaine conservé entre LCMV et LASV portant des résidus spécifiques importants dans l'interaction avec la Z. En effet, la NP de LCMV peut interagir avec la Z de LASV mais à l'inverse, la NP de LASV n'interagit pas avec la Z de LCMV [121].

⇒ Inhibition de La réponse IFN

La NP joue un rôle crucial dans l'inhibition de la réponse interféron (IFN) de type I et ainsi l'immunosuppression. La cristallisation de la NP a montré que le domaine C-terminal contient une activité exonucléase 3'-5' spécifiques des ARN double brins, laquelle est alors apparue importante pour la suppression de la réponse IFN [119, 122]. La conformation tridimensionnelle de la NP ressemble à celle des membres de la famille DEDDh des exonucléases car elle possède les résidus catalytiques Asp-Glu-Asp-Asp et His (soit D-E-D-D et H) respectivement en positions 389, 391, 466, 533 et 528, caractéristiques du site actif d'autres exonucléases DEDDh.

Les mécanismes d'inhibition de la réponse IFN par la NP seront décrits dans la partie suivante.

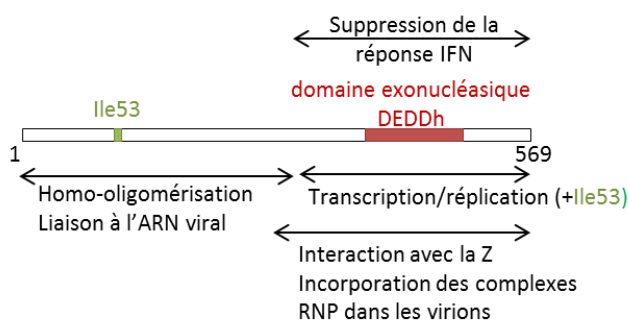


Figure 6. Domaines structuraux et fonctionnels de la NP de LASV.

– Les glycoprotéines 1 et 2

L'extrémité 5' du segment S code pour une protéine précurseur de 76 kDa, la GPC. La GPC est traduite comme un précurseur (pré-GPC) dans la lumière du réticulum endoplasmique, puis la GPC immature est obtenue après le clivage post-traductionnel d'un peptide signal stable (SSP) de 58 acides aminés (6 kDa), situé à l'extrémité N-terminale. De façon peu commune, le SSP reste

connecté à la GPC immature. Il comprend deux régions hydrophobiques qui permettent l'insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique [123]. Pendant le transport à la membrane plasmique, la GPC est maturée par clivage protéolytique en deux sous-unités GP1 (44 kDa) et GP2 (36 kDa). Pendant cette étape, le SSP agit comme un facteur *trans* de maturation puis il interagit avec le domaine transmembranaire de la GP2 par son domaine appelé TM1 [124]. Le domaine cytoplasmique de la GP agit comme un facteur essentiel de stabilisation de la conformation tridimensionnelle de la protéine et il est donc primordial pour l'accessibilité du site de clivage [125].

Les GP1 et GP2 forment des trimères à la surface de l'enveloppe virale alors que la GPC forme des monomères et des oligomères. Le clivage de la GPC est ainsi primordial pour la conformation des projections à la surface de l'enveloppe virale [126]. Dans les trimères, les GP ne sont pas liées de façon covalente. La GP1 interagit avec l' α -dystroglycane (DG) et permet l'entrée du virus dans la cellule puis la GP2 permet la fusion pH-dépendante des membranes lipidiques virale et cellulaire [127]. La GP2 est une protéine de fusion de classe I avec deux régions hydrophobiques N-terminales qui sont cruciales pour la fusion membranaire pH-dépendante. Les acides aminés Trp-264, Gly-277, Tyr-278 et Leu-280 sont notamment conservés chez tous les Arénavirus [128]. En plus de sa partie N-terminale hydrophobe, elle possède deux hélices antiparallèles séparées par une partie glycosylée. La structure et la fonction sont similaires à celles des GP des autres virus enveloppés à ARN, suggérant très probablement l'existence d'un précurseur commun notamment entre les GP2 de LASV et EBOV [129].

La séquence de la GPC et la conformation des GP à la membrane plasmique est présentée sur la figure 7.

⇒ Clivage de La GPC

La GPC est clivée en GP1 et GP2 entre la leucine 259 et la glycine 260. Le motif identifié est un site consensus conservé pour tous les souches de LASV : R-X-(L/I/V)-L₂₅₉. C'est un site homologue avec le site de reconnaissance utilisé par certaines endoprotéases [130]. Cette protéase est identifiée comme étant SKI-1/S1P, une protéase appartenant à la famille des subtilases, connue pour son rôle essentiel dans l'homéostasie des lipides et la réponse au stress du réticulum endoplasmique [131]. SKI-1/S1P appartient au groupe des pyrrolisines de la famille des subtilases et elle clive des résidus non basiques, contrairement au groupe des furines. SKI-1/S1P est une proprotéine convertase. Ces protéines sont synthétisées en tant que précurseur inactif et le clivage autocatalytique d'un prosegment N-terminal conservé est nécessaire et permet la conformation correcte de la protéase. En effet, SKI-1/S1P est synthétisée comme pré-pro-SKI-1/S1P, puis est activée après trois clivages séquentiels dans le réticulum endoplasmique : le premier par une peptidase et les deux autres sont

des clivages autocatalytiques. Ce processus d'activation de SKI-1/S1P est indispensable pour le clivage de la GPC alors qu'il n'est pas forcément nécessaire pour le clivage d'autres substrats cellulaires [132]. Une fois activée, la protéine SKI-1/S1P est transloquée dans les compartiments *cis* et *médial* du Golgi.

La GPC de LASV est clivée dans le réticulum endoplasmique ou le *cis*-Golgi, ceci nécessitant à la fois le prodomaine de SKI-1/S1P mais aussi la présence du site de reconnaissance RRLI dans la séquence de la GPC. Au contraire, la GPC de LCMV ne possédant pas ce site de reconnaissance, elle est clivée dans les endosomes tardifs.

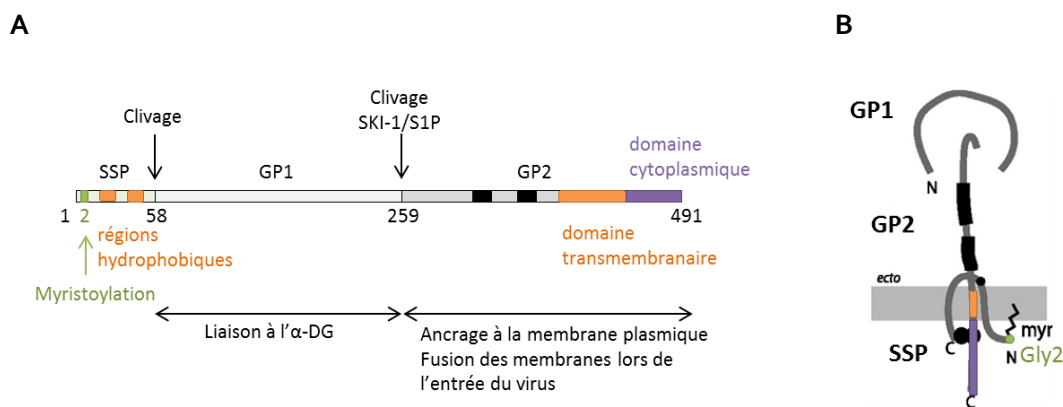


Figure 7. A. Schéma représentant les domaines structuraux de la GPC et les fonctions associées des deux sous-unités GP1 et GP2. B. Modèle de la conformation d'un monomère de GP à la surface de l'enveloppe virale. Adapté de [124].

⇒ GP soluble

L'expression de la GPC dans des cellules de mammifères résulte en une forte sécrétion de GP1 soluble qui n'est pas associée à la GP2 dans le surnageant des cellules transfectées [133]. La GP1 soluble se forme après la séparation de l'ectodomaine de la GP. Ce processus de libération de l'ectodomaine de la GP de la partie transmembranaire, similaire à celui retrouvé lors de l'infection par EBOV, est appelé « *shedding* ». Cependant, lors de l'infection par LASV, la présence de GP1 soluble n'est pas le résultat d'un clivage protéolytique médié par des métalloprotéases et elle n'est pas associée à la GP2 ou une partie. Elle est le résultat de la sécrétion directe d'une isoforme de la GP1 à partir de la GPC intracellulaire [134]. Une étude montre que la GP1 soluble est retrouvée dans le sérum de patients présentant des signes de fièvre de Lassa mais cette observation reste relativement rare. En effet, deux patients uniquement sur les 46 testés possèdent cette forme soluble de la GP1 [135].

– La polymérase L

Le segment L de LASV code pour la protéine L, une ARN polymérase ARN-dépendante de 2220 acides aminés (253 kDa). Elle contient six motifs conservés parmi les Arénavirus et autres virus à ARN simple brin de polarité négative. En effet, il n'y a que 18% de divergence dans la séquence d'acides aminés de la protéine L entre les trois souches Nigéria, Josiah et AV de LASV.

La protéine L est composée de trois domaines structuraux allant des acides aminés 1 à 457 pour le premier, 457 à 939 pour le deuxième et 939 à 2220 pour le troisième [136]. Grâce à une approche de mutagenèse, il a été montré que les résidus acides aminés importants pour la fonction de la polymérase sont regroupés au centre de la structure tridimensionnelle, dans le site catalytique. Les résidus Gly-1394 et Asp-1395 de LASV-AV sont essentiels pour la synthèse des ARNm mais pas pour la réplication de l'ARN antigénomique [137]. Sept résidus (Asp-89, Glu-102, Asp-119, Lys-122, Asp-129, Glu-180 et Arg-185) sont également importants pour la transcription et trois sont même absolument nécessaires (Asp-89, Glu-102, Asp-129) [138].

– La protéine Z

L'extrémité 5' du segment L de LASV code la petite protéine Z de 11 kDa, dont la structure est de type RING, en doigt de zinc [139]. La protéine Z de LASV est d'abord décrite comme une protéine de matrice qui s'associe à la membrane cellulaire. Elle permet de faire le lien entre les complexes RNP et la GP et donc participe à l'incorporation de ces complexes dans les virions.

⇒ *Bourgeoisement des virions*

La protéine Z est essentielle dans le relargage des particules virales. L'expression de la protéine Z dans des cellules suffit à induire le bourgeoisement de la membrane plasmique en l'absence des autres protéines virales, aboutissant à la formation de pseudo-particules virales. La protéine Z possède deux domaines tardifs riches en proline appelés PPPY et PTAP qui sont primordiaux pour l'adressage à la membrane plasmique et le bourgeoisement [140]. Certains résidus conservés situés en dehors des domaines RING et tardifs jouent également un rôle important dans l'attachement de la protéine Z à la membrane plasmique [141]. Enfin, la myristoylation de la Gly-2 est primordiale pour l'interaction de la protéine Z avec les lipides membranaires et donc pour le bourgeoisement [142, 143]. De plus, des observations microscopiques et biochimiques montrent que la protéine Z interagit directement avec le SSP de la GPC [144].

La protéine Z recrute, par l'intermédiaire des domaines tardifs, des facteurs cellulaires essentiels au bourgeoisement, comme les facteurs Tsg101, Vps4A et B et ALIX/AIP1 [145, 146]. Ces facteurs

appartiennent ou sont associés aux protéines ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) et ont un rôle dans la formation des corps multivésiculaires (MVB). Le facteur cellulaire ALIX/AIP-1 fait le lien entre les protéines Z et NP de LASV et il a été montré qu'il était primordial pour l'incorporation de la NP dans des VLP induites par la protéine Z [147].

La protéine Z interagit avec la NP [121, 148] et elle est nécessaire pour l'association de la NP aux membranes et donc pour l'incorporation des complexes RNP dans les virions.

⇒ *Transcription/réplication*

La protéine Z est aussi impliquée dans la transcription, la réplication et la traduction. Il a été montré pour LASV, LCMV et le virus Tacaribe, que la protéine Z inhibait la synthèse d'ARN en se liant avec la polymérase L [149-152]. Lors de l'infection par LCMV, la protéine Z interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4E et inhibe la traduction par son domaine RING [153, 154].

⇒ *Rôle dans l'apoptose ?*

La protéine Z peut également se lier à la protéine de la leucémie promyélocytaire (PML) dans la région N-terminale, induisant ainsi la relocalisation de la PML vers le cytoplasme [155]. La PML est normalement localisée dans les corps nucléaires, lesquels ont un rôle dans la régulation de l'apoptose. Cette interaction Z/PML pourrait alors permettre la modulation des voies de l'apoptose, expliquer la nature non cytopathique des Arénavirus et ainsi favoriser la persistance et la dissémination virale.

• *Le cycle viral*

– *Entrée du virus dans la cellule*

L' α -dystroglycane (α -DG) est le récepteur cellulaire d'entrée des Arénavirus de l'ancien monde incluant LASV, mais aussi des Arénavirus du groupe C du nouveau monde [156]. C'est une GP de surface qui fait le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus. L' α -DG est constitué d'un domaine de type mucine fortement glycosylé qui fait le lien entre les domaines globulaires N- et C-terminal. Il est sujet à des modifications post-traductionnelles sur le domaine mucine de type O-mannosylation (un type de O-glycosylation), effectuées par des glycosyltransférases incluant la protéine LARGE. Ces modifications sont primordiales pour la fonctionnalité de l' α -DG mais aussi pour permettre l'entrée de LASV, LCMV et des autres Arénavirus de l'ancien monde et du groupe C du nouveau monde [157-159]. Des études montrent que la GP de LCMV peut interférer avec les modifications post-traductionnelles de l' α -DG résultant ainsi en une diminution de l'expression d' α -DG fonctionnel à la

surface des cellules infectées et une dérégulation des interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire [160]. Très récemment, quatre autres molécules ont été décrites comme pouvant être utilisées par LASV pour entrer dans la cellule cible [161]. Axl et Tyro3 sont des récepteurs tyrosines kinases alors que DC-SIGN et LSECtin sont des lectines de type C. Ces molécules permettent la liaison du virus et l'infection indépendamment de la présence de l' α -DG. Le mécanisme d'entrée des Arénavirus pathogènes du clade B du nouveau monde (JUNV et virus Machupo, Guanarito et Sabia) est différent. Ils utilisent le récepteur 1 de la transferrine TfR1 pour entrer dans les cellules cibles [162].

L'entrée de LASV se fait par endocytose par un mécanisme similaire à celui décrit plus tôt pour LCMV [2, 163, 164]. Il est indépendant de la clathrine, de la calvéoline ou de la dynamine mais la composition en cholestérol membranaire entre en compte [165, 166]. Ensuite, tout comme LCMV, LASV est transporté grâce aux microtubules dans des vésicules d'endocytose qui mûrissent en MVB, lesquels rejoignent les endosomes tardifs [167, 168]. De nombreux facteurs cellulaires sont nécessaires à l'entrée du virus pour une infection productive. La PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*) est essentielle ainsi que l'acide lysobisphosphatidique, un phospholipide impliqué dans la formation des vésicules intraluminales du MVB des endosomes tardifs. Les protéines de la famille ESCRT (Hrs, Tsg101, Vps22 et Vps24) sont également primordiales pour l'entrée de LASV [168]. De plus, les protéines Vps4 et Alix sont associées aux protéines ESCRT et sont impliquées respectivement dans la fission et dans la dynamique des vésicules intraluminales du MVB/endosomes tardifs et participent activement lors de l'infection virale. Conformément à ces données, les endosomes tardifs possèdent un pH compatible avec celui optimal, de l'ordre de 3 à 4,5, requis pour la fusion des vésicules [169]. Le pH acide induit un changement conformationnel et la dissociation de la GP1 et de la GP2, et ainsi l'apparition du peptide de fusion de la GP2 qui s'insère dans la membrane de l'endosome. Les particules virales se trouvent ainsi libérées dans le cytosol où peut avoir lieu les étapes de réplication et transcription virales.

Les différentes étapes de l'entrée du virus sont schématisées sur la figure 8.

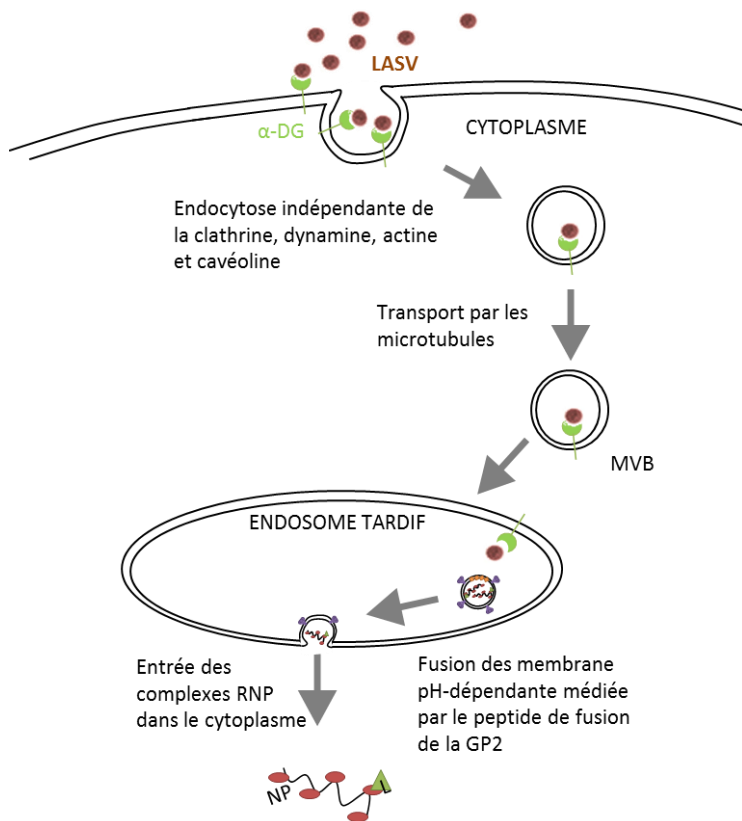


Figure 8. Entrée de LASV dans la cellule cible, transport dans les endosomes tardifs puis libération du génome viral dans le cytoplasme. D'après [2].

– Transcription et réplication virale

Après la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, les complexes RNP sont relargués dans le cytoplasme. L'ARN viral encapsidé sert de matrice pour la transcription et la réplication. La transcription aboutit à la synthèse des ARNm codant la NP et la L à partir des segments S et L respectivement. Les ARNm sont ensuite coiffés et polyadénylés. Dans les phases précoces d'infection, la transcription est favorisée par rapport à la réplication car les faibles taux de NP empêchent la polymérase L de lire l'ARN plus loin que la région intergénique. Ensuite, l'augmentation de l'expression de la NP permet de dénaturer la structure de la région intergénique et donc de répliquer l'ensemble du segment. Cependant, le rôle de la NP dans la modulation de l'équilibre transcription/réplication est encore controversé. La polymérase L synthétise un ARN antigénomique complémentaire qui sert de matrice pour la transcription des ARNm codant la GP et la protéine Z mais aussi pour l'amplification du génome viral. Les étapes de la transcription et réplication du génome virale est représenté sur la figure 9.

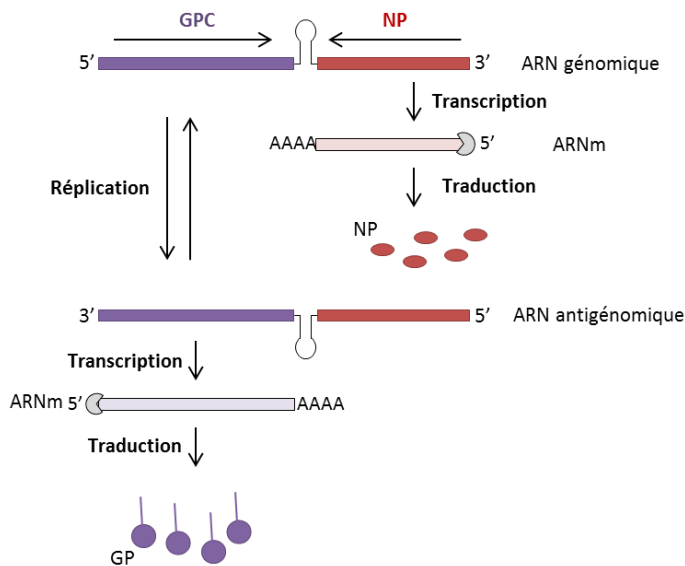


Figure 9. Schéma de la transcription et répllication du segment S du génome viral. La stratégie de codage des gènes des arénavirus étant ambisens, un ARN intermédiaire antigénomique est nécessaire pour répliquer le génome et transcrire les gènes GPC et Z. Adapté de [1].

- Bourgeonnement

Les différents composants du virus sont ensuite assemblés puis les particules virales sont relarguées par les cellules. L'assemblage des virions requiert la protéine Z qui fait le lien entre les complexes RNP et les GP et permet ainsi d'incorporer les segments d'ARN. L'étape de clivage de la GPC par la protéase SKI-1/S1P est également primordiale pour le bourgeonnement. Le rôle spécifique des différentes protéines de LASV dans cette dernière étape du cycle viral est détaillé précédemment et dans la figure 10.

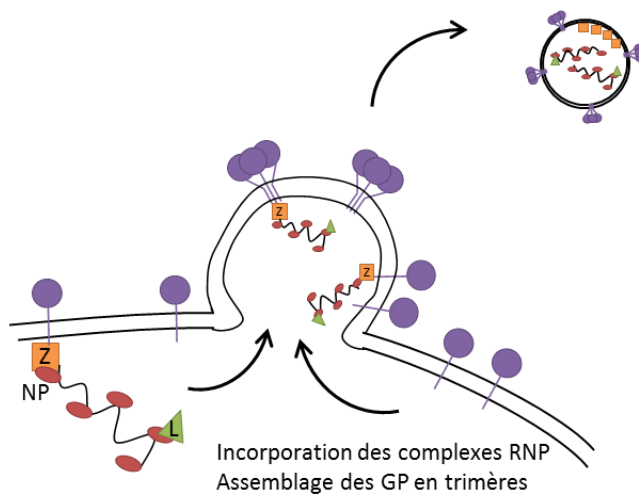


Figure 10. Bourgeonnement des particules virales.

- *Les outils*

Afin d'analyser la séquence virale génomique, d'étudier le rôle des protéines virales et les étapes du cycle viral et de déterminer les facteurs importants dans la pathogenèse de la fièvre de Lassa, des outils permettant de modifier les virus sauvages ont été élaborés.

⇒ *Obtention de virus réassortants*

Le génome des Arénavirus étant bisegmenté, il est possible, en co-infectant des cellules avec deux Arénavirus, d'obtenir des virus réassortants, c'est-à-dire possédant un segment génomique de chacun des virus. Cette technique permet de caractériser de façon fonctionnelle les segments S et L dans leur globalité. La coinfection de cellules par LASV et MOPV, un Arénavirus non pathogène, a permis l'obtention de virus réassortants MOPV/LASV encapsidant le segment L de MOPV et le segment S de LASV [170]. Ces virus réassortants étant atténués chez l'animal, ces travaux suggèrent que la virulence des Arénavirus est portée par les gènes sur le segment L.

⇒ *La génétique inverse*

Grâce aux techniques de génétique inverse, il est désormais possible de créer des virus artificiellement à partir d'ADNc clonés tout en maîtrisant la séquence du génome viral. On peut alors construire des virus recombinants comportant des gènes mutés afin d'étudier le rôle biologique des protéines virales dans des cellules puis dans un organisme entier. Ces techniques permettent notamment d'étudier les facteurs de virulence importants dans la pathogenèse au niveau génétique [171]. Par exemple, le premier système de génétique inverse des Arénavirus a permis de créer des LCMV recombinant exprimant la GP du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [172]. Grâce au premier système de génétique inverse de LASV, l'importance des régions 3' et 5' non codantes du segment S dans la virulence a été mise en évidence [173].

Un système de génétique inverse de LASV a été récemment développé au laboratoire [174]. Il est décrit dans la figure 11. Des virus recombinants portant des mutations dans la séquence du gène de la NP ont ainsi été fabriqués et ont été utilisés dans le cadre de cette thèse. Dans notre système, les LASV recombinants sont obtenus en transfectant la lignée hamster BHK-T7 par plusieurs plasmides. Cette lignée de cellules est appelée ainsi car elle exprime de façon stable la polymérase T7. Les plasmides transfectés sont de deux types : ceux encodant le génome viral dans sa globalité et ceux encodant les facteurs viraux essentiels à la transcription et réplication du génome viral. Deux plasmides pTM1 encodant la NP et la polymérase L de LASV sous le contrôle du promoteur T7 sont transfectés ainsi que deux plasmides pRF108 codant le segment S de LASV pour l'un et le segment L pour l'autre sous le contrôle du promoteur de la polymérase ARN murine I (Poll) [175, 176]. La Poll a

la particularité de synthétiser des molécules d'ARN non polyadénylés et non coiffés. Dans les cellules BHK-T7 transfectées par ces 4 plasmides en même temps, la polymérase T7 permet la synthèse de la NP et de la polymérase virale L ainsi que la synthèse d'ARN antigénomique des segments S et L. Ces ARN servent alors de matrice pour la synthèse d'ARN génomique viral. Il faut noter que, contrairement aux virus à ARN de polarité positive, le matériel génétique de LASV et des Arénavirus en général ne peut pas fonctionner comme des ARNm et n'est donc pas directement infectieux. L'expression de toutes les protéines virales, la réplication du génome et donc la formation de particules infectieuses requièrent la synthèse d'un intermédiaire ARN transcomplémentaire de l'ARN viral. L'obtention de virus par génétique inverse est un procédé laborieux. La probabilité qu'une cellule BHK-T7 incorpore les quatre plasmides en même temps et que toutes étapes de réplication s'enchaînent sans encombre est extrêmement faible. C'est pourquoi le nombre de particules virales obtenues directement après transfection est limité. Il est alors nécessaire de faire plusieurs passages de virus sur des cellules VeroE6, compétente pour la réplication, afin d'obtenir un titre viral exploitable. Par ailleurs, le choix des mutations introduites artificiellement dans la séquence du génome viral est particulièrement difficile car toutes ne permettent pas d'obtenir un virus recombinant et peuvent être éliminées au fil des passages. Notre laboratoire a récemment généré plusieurs LASV recombinants en introduisant des mutations dans la séquence de la NP. L'arginine en position 393 a été remplacé par une alanine pour dans la séquence de la NP de LASV NP-R393A. Les LASV NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A possèdent deux mutations : en position 389, l'acide aspartique est remplacé par une thréonine ou une alanine et en position 392, une alanine remplace la glycine.

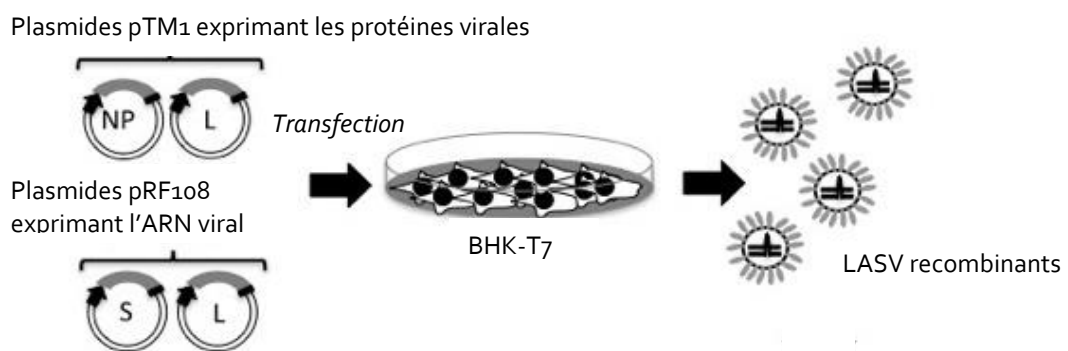


Figure 11. Système de génétique inverse permettant de produire artificiellement des LASV recombinants.

Un autre système appelé « minigénome » ou « système du réplicon » se base sur les techniques de génétique inverse et permet d'étudier les étapes du cycle réplcatif du virus sans forcément produire

de particules virales infectieuses. Le premier minigénome de LASV a permis de montrer que la NP et la protéine L étaient les facteurs minimaux *trans* requis pour la transcription et la réplication virale [177]. C'est d'ailleurs pourquoi des plasmides codant la NP et polymérase L sont transfectés en même temps que les plasmides encodant le génome viral afin qu'il puisse être transcrit et répliqué et donc que des particules virales puissent être produites. Le système du réplicon a également permis d'étudier le rôle des séquences non codantes dans la région intergénique et aux extrémités dans la réplication virale. Il a ainsi été montré que la séquence intergénique permettait de stopper la transcription des gènes viraux et que les extrémités 5' et 3' étaient complémentaires et pouvaient s'associer pour former une structure secondaire en épingle à cheveux [116, 178].

Ces outils ont permis d'améliorer considérablement la compréhension des mécanismes viraux et peuvent être utilisés pour la création d'un vaccin.

Traitements de la fièvre de Lassa

Dès les premiers cas de fièvre de Lassa, des recherches de molécules chimiques antivirales ont été initiées. Des essais de traitements des malades avec du sérum immun de patients convalescents ont également été faits et seront décrits dans la partie suivante.

– La ribavirine

La ribavirine (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) est un antiviral à large spectre synthétisé pour la première fois en 1972. C'est une molécule peu toxique dont l'efficacité a été démontrée dans de nombreuses infections virales incluant celles par le virus respiratoire syncytial, le virus de la grippe, le virus de la rougeole, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et les virus de l'herpès et des hépatites. Le traitement par la ribavirine peut quelquefois provoquer une anémie mais celle-ci n'est que transitoire et réversible.

L'efficacité de la ribavirine contre LASV a été démontrée pour la première fois dans un modèle singe rhésus [96]. Chez les singes traités, elle permet la disparition de la virémie dans les phases précoces de l'infection et la suppression du pic viral qui apparaît entre 7 et 12 jours chez les singes non traités. Les travaux chez le PNH montrent cependant que la ribavirine est efficace uniquement lorsqu'elle est administrée de façon précoce entre 0 et 4 à 5 jours après l'infection. Combinée avec des sérums immuns, la ribavirine reste efficace administrée plus tardivement [98, 99]. Lors d'essais en Sierra Leone, il a été montré que la ribavirine réduisait de 55 à 5% la mortalité des cas de fièvre de Lassa lorsqu'elle était administrée en intraveineux et dans les 6 premiers jours de la maladie [179]. La voie

orale d'administration de la ribavirine peut être utilisée, bien qu'étant un peu moins efficace que l'injection intraveineuse.

Cependant, lors des essais chez les macaques, il est apparu que des doses fortes supérieures à 30 mg par kilo étaient toxiques. Afin de diminuer le dosage de la ribavirine et donc de limiter les effets secondaires, des essais de traitements combinés de la ribavirine avec d'autres molécules antivirales ont été effectués. Dans un modèle hamster infecté par PICV, l'effet synergique de l'IFN alfacon-1 avec la ribavirine permet de ralentir de la progression de la maladie et de réduire la mortalité [180].

La ribavirine est un analogue de la guanosine. Ses effets sont multiples : diminution de la GTP intracellulaire, inhibition des ARN polymérase et du coiffage 5' des ARNm viraux et augmentation du taux de mutations de l'ARN viral. Cependant, les études récentes laissent à penser que l'effet antiviral de la ribavirine contre LASV semble davantage être dû à la mutagenèse de l'ARN viral plutôt qu'à la diminution du stock de GTP intracellulaire [181-183].

Malgré des résultats encourageants, l'utilisation de la ribavirine reste limitée dans les pays endémiques de par son coût élevé, sa disponibilité et la nécessité d'être administrée à un stade précoce de la maladie. Par ailleurs, la ribavirine ne permet pas d'éviter la surdité chez les survivants de la fièvre de Lassa et sa tératogénicité l'empêche d'être utilisée chez les femmes enceintes.

⇒ *Autres analogues de nucléosides*

Comme la ribavirine, deux autres analogues de nucléosides ont été testés lors de l'infection par LASV : la zidampidine, un dérivé de l'AZT déjà utilisé dans le traitement contre le HIV et la stampidine dont l'efficacité antivirale contre les souches HIV-1 et HIV-2 a également été montrée. Des souris ont été infectées par injection intracrânienne létale avec LASV. La survie a été améliorée après traitement par la zidampidine et aucun signe clinique de la maladie n'a été noté [184, 185]. La validité de ses analogues de nucléosides reste encore discutable puisque leur efficacité n'a pas été montrée dans un modèle PNH plus proche de l'homme.

– Recherche de nouveaux traitements

Afin de remplacer ou compléter la ribavirine, de nombreuses autres thérapeutiques ciblant différentes étapes du cycle viral ont été testées.

⇒ *Neutralisation du virus*

Des essais de neutralisation de LCMV puis LASV ont été réalisés. Un fragment de l' α -DG contenant à la fois les sites de liaison du virus et des molécules de la matrice extracellulaire a été créé mimant

le rôle des anticorps neutralisants absents lors de l'infection. Cette approche est apparue non valide puisque ce fragment seul ou même couplé à un fragment Fc ne permettait pas de neutraliser le virus [186].

⇒ *Inhibition de l'entrée du virus*

Lors de l'entrée du virus, l'étape de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire peut être inhibée par la petite molécule lipophile LJ001, efficace contre tous les virus enveloppés [187]. Cette étape de fusion des membranes peut également être empêchée en ciblant l'interaction entre le SSP et la GP2 [124]. La molécule ST-193 exerce son activité antivirale contre LASV et plusieurs autres Arénavirus (mais pas LCMV) en stabilisant cette interaction et en bloquant la fusion membranaire [188, 189]. Testé chez le cobaye S13 infecté par LASV, il permet de diminuer les signes de la maladie à l'exception d'une fièvre élevée mais transitoire, de réduire la virémie et d'augmenter ainsi la survie des animaux [190].

⇒ *Inhibition de la transcription/réplication virale*

Certaines molécules peuvent cibler l'étape de transcription/réplication virale. En effet, il a été montré que l'antibiotique pyrazofurine diminuait la réplication de nombreux virus à ARN incluant LASV, LCMV et PICV dans un modèle *in vitro*. Cependant, les essais *in vivo* se sont révélés peu concluants. En effet, la pyrazofurine ne permet pas de limiter la réplication de PICV chez les cobayes [191]. Le T-705 ou favipiravir, actuellement en essai clinique pour le traitement de la grippe, inhibe la transcription/réplication de LCMV et des Arénavirus du nouveau monde en ciblant la polymérase L [192]. *In vivo*, le T-705 est efficace et non toxique dans les modèles hamster et cobaye infectés par PICV et les signes cliniques de la maladie et les titres viraux sériques sont apparus réduits [193, 194]. Le T-705 pourrait ainsi être appliqué au traitement de la fièvre de Lassa mais d'autres travaux sont nécessaires pour valider son efficacité et l'absence de toxicité chez le PNH.

Les techniques d'interférence ARN ont également été utilisées pour réduire l'expression des gènes de LCMV et ainsi inhiber la réplication virale [195]. Des petits ARN interférants ciblant les séquences des ARNm codant la polymérase L et la protéine Z ont permis de limiter la réplication virale. Cependant, dans cette étude, la transfection de ces ARN n'a pas conduit à l'inhibition de la transcription. De plus, ils sont efficaces uniquement lorsqu'ils sont délivrés à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'un vecteur Adénovirus recombinant. D'autres travaux ont également montré que des ARN interférants transfectés ciblant des régions terminales conservées en amont des gènes NP et L pouvaient réduire l'expression de ces gènes et inhiber la réplication de LASV, MOPV et LCMV [196]. La thérapie par ARN interférence est une alternative intéressante à la ribavirine et aux

autres molécules chimiques pour permettre le contrôle de l'infection par LASV mais d'autres travaux sont nécessaires afin de valider cette méthode notamment *in vivo*.

⇒ *Inhibition de La formation des particules virales*

La formation de particules virales infectieuses nécessitant le clivage de la GPC par la protéase SKI-1/S1P, de nouvelles stratégies antivirales ciblant cette étape du cycle virale et inhibant SKI-1/S1P ont été développées [197]. Par exemple, la petite molécule PF-429242 inhibe spécifiquement SKI-1/S1P et ainsi empêche le clivage de la GPC de LASV (mais pas celle de LCMV car le clivage de la GPC est médié par des furines) [198]. L'expression du variant α_1 -antitrypsine possédant les sites de reconnaissance de SKI-1/S1P permet d'inhiber le clivage de la GPC de LASV et donc de limiter la réplication virale [199].

La formation des particules virales peut également être inhibée par le biais de l'expression de la protéine cellulaire tétherine (BST-2, CD317). C'est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à des degrés différents dans de nombreux types cellulaires et qui est connue pour inhiber le relargage de nombreux virus enveloppés. Lors de l'infection par LASV, la surexpression de la tétherine inhibe le bourgeonnement des particules virales *in vitro* en ciblant la protéine Z [200, 201]. L'origine de l'activité antivirale de la tétherine n'est pas connue mais il semblerait qu'elle permette de bloquer les particules virales à la membrane cellulaire. Des travaux restent toutefois nécessaires afin de déterminer si la modulation de l'expression de la tétherine pourrait participer au contrôle de la réplication de LASV *in vivo*.

⇒ *Inhibition de voies cellulaires nécessaires au virus*

La recherche de nouvelles thérapies pour le traitement de la fièvre de Lassa s'est également tournée vers le ciblage de certaines molécules ou voies de signalisation cellulaires utilisées par le virus. PICV, un Arénavirus proche de LASV, a notamment été utilisé comme modèle simplifié de l'infection par LASV.

Le XBY-S2 est un aptamère et un leurre qui se lie au facteur de transcription AP-1. Il induit alors la production de cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α par les macrophages et permet de diminuer la mortalité de cobayes infectés par PICV [202].

La génistéine, un inhibiteur de tyrosine kinase, empêche à la fois l'entrée et la réplication de PICV *in vitro* car ces deux étapes requièrent l'activité des kinases cellulaires pour la phosphorylation de facteurs de transcription et autres substrats [203]. L'association de la génistéine avec un autre inhibiteur de kinases, la tyrphostine AG1478, empêche également l'infection par LASV [204].

Le bavituximab est un anticorps chimérique qui se lie aux phosphatidylsérines qui se trouvent exposées suite à l'infection par PICV [205]. Testé lors de l'infection de cobayes par ce virus, il apparaît efficace et non toxique et peut être combiné avec la ribavirine pour un effet synergique. Le bavituximab permettrait l'élimination des virus dans le sang ainsi que la lyse des cellules infectées par le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps.

Enfin, la recherche de nouvelles molécules antivirales a également ciblé la modulation des voies du stress oxydatif, mal connues lors de l'infection par LASV mais bien étudiées lors des infections par les Filovirus. Une petite molécule, NSC 62914, ayant des propriétés antioxydantes a ainsi été découverte [206]. Elle permet de contrôler les infections par les Ebolavirus et Marburgvirus *in vivo* chez la souris et également d'inhiber la réplication de LASV *in vitro*.

Un arénavirus non pathogène : le virus Mopeia

Peu après les premières épidémies de fièvre de Lassa, un variant antigénique proche de LASV est découvert au Mozambique chez le *Mastomys natalensis*, le réservoir de LASV [207]. Il apparaît similaire à LASV par sa morphologie et est détecté par des anticorps spécifiques de LASV. Par la suite, de par ses différences phylogénétiques avec LASV, ce variant a été classé comme un nouvel Arénavirus de l'ancien monde à part entière et a été appelé virus Mopeia (MOPV). MOPV est également retrouvé au Zimbabwe chez les espèces *Mastomys natalensis* et *Aethomys chrysophilus* [208], en Afrique du Sud et en Tanzanie [209]. Plusieurs souches de MOPV ont ainsi été isolées : Mozambique, AN20410 et AN21366. Les séquences nucléotidiques du segment S de ces différentes souches sont homologues à près de 80% [210].

⇒ *Similitudes*

Le fait que des anticorps anti-LASV puissent détecter MOPV indique que ces deux virus sont très proches d'un point de vue antigénique. De plus, les alignements de séquences nucléotidiques de MOPV et LASV démontrent que les segments S et L sont fortement conservés quelles que soient les souches de virus. Par exemple, il a été montré que le segment L de LASV-Josiah possédait 60% d'homologie avec celui de MOPV-AN20410 et que les protéines Z et L de ces deux souches de virus étaient aussi homologues à 57% [210]. Il est à noter que la notion d'homologie entre séquences est très forte puisqu'elle contient une notion de spéciation entre les virus c'est-à-dire qu'elle suppose l'existence d'un ancêtre commun à partir duquel les deux virus ont évolué. Les sites de clivage et les sites de glycosylation de la GPC sont conservés [211]. MOPV utilise d'ailleurs le même récepteur cellulaire α -DG que LASV pour entrer dans la cellule cible. Les sites de glycosylation de la NP sont

également conservés entre MOPV et LASV ainsi que le site de myristoylation Gly-2 de la protéine Z [143, 211].

Le nombre de nucléotides des régions non codantes et des gènes de chaque segment ainsi que le nombre d'acide aminés des protéines virales sont donnés dans le tableau III pour les souches utilisées dans la suite de ce manuscrit : LASV-AV et MOPV-AN21366.

⇒ *Différences*

MOPV n'a jamais été associé à une FH ou à d'autres pathologies. De plus, la présence d'anticorps trouvés chez des écoliers au Zimbabwe indique que les hommes sont infectés par MOPV sans pour autant développer de maladie. Ces observations suggèrent que MOPV n'est pas pathogène pour l'homme [212]. Des singes rhésus infectés par MOPV ne développent pas de virémie et le virus n'est pas détecté dans les tissus des animaux. A l'exception de quelques lésions hépatocellulaires et au niveau des tubules rénales, l'infection de PNH confirme que MOPV est atténué [104].

Les premiers travaux montrent que la différence de pathogénicité n'est pas la seule différence entre MOPV et LASV. De plus, l'alignement des séquences de MOPV et LASV indique que des différences se trouvent dans la région intergénique non codante du segment S. En effet, MOPV possède deux structures secondaires en épingles à cheveux alors que LASV n'en a qu'une seule. Ces structures ont une séquence similaire et il a été suggéré qu'elles étaient issues d'une duplication lors de la réplication virale [211].

La comparaison de LASV avec un virus très proche mais non pathogène pour l'homme comme MOPV constitue un excellent modèle permettant de déterminer les facteurs biologiques importants dans la virulence et ainsi d'améliorer la compréhension des réponses immunitaires et des mécanismes de pathogénèse induits lors de la fièvre de Lassa.

Tableau III. Comparaison entre les séquences des souches LASV-AV et MOPV-AN21366 utilisées dans le cadre de cette thèse. Le nombre de nucléotides (nt) des gènes et séquences non codantes (extrémités 5' et 3' et région intergénique (IGR)) ainsi que le nombre d'acide aminés (aa) des protéines virales sont précisés. Il est à noter que le séquençage des extrémités 5' et 3' des segments S et L est particulièrement difficile et c'est pourquoi le nombre de nt varie pour une même souche de virus entre les différentes séquences publiées dans GenBank.

		Segment S								
		extr. 5'	GPC		IGR	NP		extr. 3'	Total	
Virus	n° Genbank	nt	nt	aa	nt	nt	aa	nt	nt	Réf.
LASV-AV	AF246121/ FR832711	53/54	1476	491	61	1710	569	91	3391/ 3392	[22, 174]
MOPV-AN21366	JN561684/ M33879	4/46	1470	489	123	1713	570	67	3334/ 3353	[211, 213]

		Segment L								
		extr. 5'	Z		IGR	L		extr. 3'	Total	
Virus	n° Genbank	nt	nt	aa	nt	nt	aa	nt	nt	Réf.
LASV-AV	AY179171/ FR832710	47/67	300	99	99	6663	2220	118/ 138	7227/ 7267	[174, 214]
MOPV-AN21366	JN561685	79	312	103	110	6714	2237	56	7271	[213]

Les réponses immunitaires lors de la fièvre de Lassa

On distingue classiquement deux types de réponse immunitaire : la réponse innée et la réponse adaptative ou acquise. Ces deux réponses diffèrent en plusieurs points. La réponse immunitaire innée est rapidement mise en œuvre après l'infection, elle est non spécifique de l'antigène et dépourvue de mémoire. Au contraire, la réponse immunitaire adaptative ou acquise est initiée plus tardivement, elle est spécifique de l'antigène et permet la mise en place d'une mémoire immunitaire cruciale. Malgré leur mise en place décalée dans le temps, les réponses immunitaires innée et adaptative agissent en synergie et leurs acteurs sont interconnectés.

La réponse innée

- *Infection des cellules présentatrices d'antigène*

Les études *in vitro* montrent que les cellules dendritiques (DC) et les macrophages dérivés de monocytes sont sensibles à l'infection par LASV et produisent de grandes quantités de particules virales [74, 75, 215]. Les monocytes non différenciés ne sont au contraire pas infectables par LASV. L'infection des DC plasmacytoïdes par les Arénavirus n'a été que peu étudiée. Il a été montré que l'infection des DC plasmacytoïdes par LCMV était productive. De plus, des données selon lesquelles la GP de LASV se lie aux protéines des DC plasmacytoïdes suggèrent qu'elles seraient également infectées par LASV [216].

Les CPA sont également sensibles à l'infection par MOPV [215, 217]. De plus, elles répliquent ce virus et produisent des quantités de particules virales équivalentes à celles produites lors de l'infection par LASV. Ces données suggèrent ainsi que la réplication virale ne serait pas à l'origine de la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV.

- *Activation des CPA*

Les monocytes circulants dans le sang, caractérisés par l'expression des molécules CD (*Cluster of Differentiation*) 14 et CD11c, peuvent se différencier en DC sous l'influence des facteurs GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*) et Interleukine (IL)-4 [218] ou du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) - α : elles sont ainsi appelées DC dérivées de monocytes. Les monocytes peuvent également se différencier en macrophages en présence du facteur M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*). Les réponses des CPA peuvent ainsi être étudiées dans des modèles *in vitro* à partir de DC et macrophages dérivés de monocytes.

Ainsi, dans un modèle *in vitro*, il a été montré que les DC et macrophages n'étaient pas activés suite à l'infection par LASV. En effet, l'expression des molécules de surface CD86, CD80, CD40, CD83, CD54, HLA-DR, HLA-abc, reflétant l'activation/maturation et impliquées dans l'adhésion, la présentation des antigènes et la costimulation des lymphocytes T est restée constante après l'infection. LASV se réplique dans ces cellules sans modifier non plus leur capacité de maturation, de migration en réponse à des chemokines telles que CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) ou la phagocytose [75].

L'infection des DC par MOPV n'induit pas l'activation de ces cellules tandis que les macrophages sont rapidement et fortement activés *in vitro* par MOPV [217]. En effet, l'augmentation de l'expression de CD86, CD80, CD40 (costimulation), CD54 (adhésion), et HLA-abc (CMH I) à la surface des macrophages infectés par MOPV a été observée *in vitro*. Ces données suggèrent fortement que la différence d'activation des macrophages lors des infections par LASV et MOPV serait à l'origine de la différence de pathogénicité de ces deux virus. Ainsi, l'absence d'activation des CPA et notamment des macrophages, pourrait être à l'origine de l'immunosuppression et de la pathogénicité de LASV.

– Conséquences sur la réponse immunitaire innée et adaptative

Les DC jouent un rôle clé au sein du système immunitaire [219]. Elles sont capables de répondre à différents pathogènes, de sécréter de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN de type I, et sont capables d'activer et moduler la réponse des cellules T. Les DC font également le lien entre immunité innée non spécifique de l'antigène et immunité adaptative spécifique de l'antigène. Elles ont une grande capacité migratoire et s'accumulent très rapidement au site où le pathogène est présent. La maturation des DC est régulée par de nombreux facteurs incluant des molécules dérivées de pathogènes, l'équilibre entre signaux pro- et anti-inflammatoires locaux et les médiateurs produits par les cellules T. Lors de la maturation des DC, elles quittent les tissus enflammés *via* la circulation lymphatique pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. La maturation est associée à un changement de morphologie des cellules avec perte des molécules d'adhésion, réorganisation du cytosquelette d'actine et acquisition d'une grande mobilité. Elle est aussi liée à la diminution de l'expression des récepteurs de l'endocytose/phagocytose, l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86, l'augmentation de la production des molécules du CMH de classe II et à la translocation des complexes CMH/peptide à la surface des cellules où ils restent stables pendant des jours permettant de présenter l'antigène aux lymphocytes T CD4+.

L'absence d'activation des CPA joue un rôle certain dans la pathogenèse de la fièvre de Lassa car d'une part, elles participent à la dissémination du virus dans l'organisme et d'autre part, l'absence d'expression des molécules impliquées dans la costimulation des cellules T à la surface des CPA infectées suggèrent que la réponse adaptative est également affectée. En effet, les macrophages qui sont activés par MOPV et non par LASV ont un rôle central dans l'induction des réponses immunitaires et dans le contrôle de l'infection.

- *La reconnaissance de l'antigène*

- Notion de PRR et de PAMP

Le système immunitaire inné est capable de discriminer les molécules du soi de celle appartenant à des pathogènes. Il reconnaît les virus et d'autres pathogènes par le biais d'un nombre limité de récepteurs spécifiques de l'immunité innée appelés PRR (*pattern-recognition receptor*). Contrairement aux récepteurs de l'immunité adaptative, les PRR sont encodés par la lignée germinale et ne subissent aucun réarrangement. Les PRR sont exprimés de façon constitutive par certaines cellules comme les CPA (DC et macrophages) mais aussi les cellules Natural Killer (NK). Ainsi, ces cellules jouent un rôle essentiel dans la surveillance des infections, sont les premières en contact du pathogène et peuvent alors initier les réponses immunes. Les PRR reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes, stables et conservés, appelés PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) [220]. Les PRR reconnaissant les motifs des virus à ARN appartiennent à deux grandes familles : les récepteurs *Toll-like* (TLR) exprimés à la surface des cellules ou dans la membrane des endosomes et les hélicases présentes dans le cytoplasme [220, 221]. Les ARN viraux double brin et simple brin sont reconnus par les TLR3 et TLR7/8 respectivement. Les TLR2 et TLR4 peuvent être impliqués dans la reconnaissance de certaines protéines virales d'enveloppe. Le TLR4 reconnaît par exemple la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial. Le TLR2 est impliqué dans la reconnaissance de l'hémagglutinine du virus de la rougeole et de certaines molécules non déterminées du cytomégalovirus humain et du virus herpès simplex de type 1. Les hélicases RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) et MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) sont des senseurs importants des ARN viraux double brin. Il a été montré que RIG-I reconnaît des ARN simple brin possédant un triphosphate à l'extrémité 5' et au moins une structure secondaire double brin [222]. MDA-5 reconnaît des longues molécules ARN double brin mais l'association avec une structure ARN simple brin semble également être nécessaire [223].

La liaison des PAMP viraux avec leur PRR induit plusieurs types de signaux pouvant aboutir à la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoire et des IFN de type I. L'activation de TLR2 aboutit plutôt à la production de médiateurs pro-inflammatoires qu'à une réponse IFN spécifique.

L'engagement d'un TLR déclenche l'activation d'une cascade de signalisation incluant notamment le recrutement d'une molécule adaptatrice comme MyD88 ou TRIF et aboutissant à la transcription des gènes impliqués dans la défense de l'hôte. Par exemple, l'engagement de TLR3 permet le recrutement de TRIF puis l'activation d'un complexe TBK1/IKK- ϵ , lequel induit la phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription IRF-3 (*IFN regulatory factor 3*). La cascade d'activation suivant l'engagement de TLR7/8 passe par MyD88 et aboutit à l'activation de facteurs de transcription comme IRF-7 qui induisent la transcription des gènes IFN- α . Les hélicases RIG-I et MDA-5 permettent également l'induction de la réponse IFN de type I par le recrutement de la protéine adaptatrice IPS-1/MAVS/CARDIF/VISA et une cascade similaire à celle induite par TRIF. Les gènes des cytokines pro-inflammatoires sont transcrits majoritairement suite à l'activation de MyD88. D'autres facteurs de transcription comme IRF-5, AP-1 et NF- κ B induisent la transcription du gène de l'IFN- β et des cytokines pro-inflammatoires.

– La reconnaissance de LASV : hypothèses

Les mécanismes de reconnaissance de LASV et des Arénavirus en général ont été peu étudiés. L'entrée de LASV et de nombreux virus enveloppés passe par les compartiments endosomaux et on peut donc penser que LASV pourrait être reconnu directement dans les endosomes par des TLR exprimés à la membrane des endosomes comme les TLR7/8 ou le TLR3. Grâce au pH acide présent à l'intérieur des endosomes, la dégradation des nucléocapsides pourrait ainsi laisser apparaître l'ARN viral pour la reconnaissance par l'intermédiaire de ces TLR. Cependant, il n'y a que très peu d'étude concernant la reconnaissance de LASV par les TLR3 et TLR7/8. Bien que LASV utilise la voie des endosomes pour entrer dans la cellule, il est peu probable qu'il soit reconnu par le TLR3 puisque la réplication virale menant à l'apparition d'ARN double brin a lieu dans le cytoplasme. Une étude a d'ailleurs montré que des souris TLR3^{-/-} n'était pas plus susceptible à l'infection par LCMV et donc que TLR3 ne serait pas essentiel pour l'initiation des réponses IFN suite à l'infection par LCMV [224]. Une étude *in vivo* chez la souris a montré que la souche Clone 13 de LCMV infectait les DC plasmacytoïdes et induisait des réponses innées et adaptatrices médiée par le TLR7, suggérant ainsi que ce PRR pourrait participer à la reconnaissance de LCMV voire d'autres Arénavirus [216].

Des études récentes suggèrent que le TLR2 pourrait être impliqué dans la reconnaissance de LCMV et d'autres Arénavirus. En effet, la cascade de signalisation passant par TLR2/MyD88 semble essentielle pour la production de cytokines pro-inflammatoires lors de l'infection par LCMV chez la souris [225]. De plus, l'infection par MOPV, mais pas LASV, induit la production de cytokines pro-inflammatoires par le biais du complexe TLR2/MAL (MAL permettant le recrutement de MyD88) [226].

Lors de la réplication virale, le génome ARN de LASV se retrouve dans le cytoplasme et se trouve ainsi potentiellement accessible pour les hélicases RIG-I et MDA-5. Des expériences de *silencing* des hélicases suggèrent que RIG-I, mais pas MDA-5, participerait à la reconnaissance de LASV par le groupement triphosphate à l'extrémité 5' des ARN. L'engagement de RIG-I par les ARN de LASV serait ainsi responsable de l'activation du promoteur de l'IFN- β [227]. Une autre étude récente montre que JUNV, un Arénavirus du nouveau monde, induit également une réponse IFN par l'intermédiaire de RIG-I [228]. La structure reconnue par MDA-5 n'est pas clairement identifiée et il est probable que cette hélicase ne reconnaisse que des ARN double brin produit durant la réplication. Or, la réplication des virus à ARN simple brin de polarité négative ne produit que peu d'intermédiaire double brin [229]. Toutes ces données suggèrent que MDA-5 n'interviendrait pas dans la reconnaissance de LASV. Cependant, d'autres travaux sont bien évidemment nécessaires pour confirmer ces hypothèses.

– Inhibition de la synthèse d'IFN : rôle des protéines virales

Afin d'empêcher leur reconnaissance par les PRR, la réponse IFN puis l'induction des réponses immunitaires, les virus ont développé différentes stratégies antivirales.

La NP de LCMV est la première à avoir été identifiée comme un inhibiteur de l'induction de la réponse IFN [230]. Elle bloque l'activation d'IRF-3 et donc sa translocation nucléaire. La transcription des IFN- α/β s'en trouve alors inhibée. De la même façon, la NP de LASV empêche la translocation nucléaire d'IRF-3 et l'activation du promoteur de l'IFN- β mais aussi des promoteurs dépendants d'IRF-3 [231]. D'autres données récentes ont montré que la NP de LASV se liait au facteur IKK- ϵ , inhibait son activité autocatalytique et ainsi le séquestrait dans sa forme inactive [232]. La présence de la forme active de IKK- ϵ est primordiale pour la phosphorylation d'IRF-3 et donc pour sa translocation nucléaire. Des données ont montré que, de par son activité exonucléasique, la NP de LASV empêchait la reconnaissance des ARN doubles brins par le récepteur RIG-I en les digérant [233]. Cette étude suggère que la NP de LASV pourrait interférer avec la cascade d'activation initiée par RIG-I menant à l'induction de la réponse IFN en supprimant les signaux d'activation de ce récepteur. Ainsi, LASV serait capable de supprimer la réponse IFN par l'inhibition de l'activation d'IRF-3 et la destruction des signaux d'activation ARN. De plus, des données récentes ont montré que la NP de LASV était capable d'inhiber la translocation nucléaire et l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF- κ B [234]. Ainsi, la NP jouerait également un rôle dans l'inhibition de la réponse pro-inflammatoire. Un modèle simplifié du rôle de la NP de LASV dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée est présenté sur la figure 12.

De plus, il a été récemment montré que la protéine Z des Arénavirus du nouveau monde avait un rôle immunosuppresseur. En effet, elle est capable d'interagir avec RIG-I, d'interférer dans l'interaction entre RIG-I et sa molécule adaptatrice IPS-1/MAVS/CARDIF/VISA, et donc d'empêcher la synthèse d'IFN- β [235]. Cependant, d'après cette étude, la protéine Z de LASV ne se lie pas à RIG-I et ne semble pas être impliquée dans l'inhibition de la production d'IFN- β .

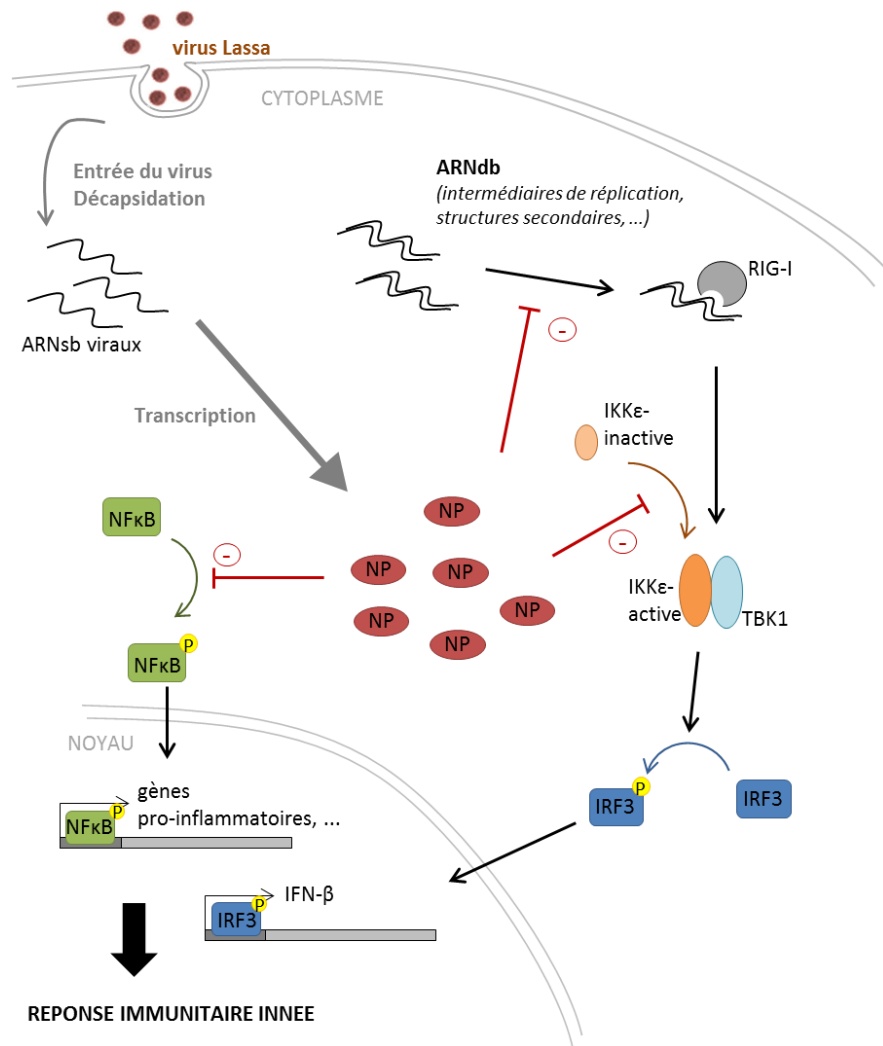


Figure 12. Modèle simplifié du rôle de la NP dans l'inhibition de la production d'IFN de type I et des réponses immunes. Suite à l'entrée de LASV dans la cellule cible et la décapitation, les ARN viraux apparaissent et sont reconnus par l'hélicase RIG-I. Il s'ensuit une cascade d'activation passant par la phosphorylation d'IRF-3 par le complexe TBK1/IKK- ϵ . Les facteurs de transcription IRF-3 et NF- κ B sont transloqués dans le noyau pour initier la transcription des gènes IFN et pro-inflammatoires. La NP semble capable d'inhiber plusieurs étapes de cette cascade d'activation. Elle empêche l'activation du facteur IKK- ϵ et donc la translocation d'IRF-3. Elle inhibe également la translocation nucléaire et l'activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B. Enfin, la NP digère les ARN double brin et empêche ainsi leur reconnaissance par l'hélicase RIG-I. D'après [231-234].

- *Réponse IFN de type I*

La réponse IFN de type I (ou IFN- α/β) constitue la première ligne de défense antivirale [236, 237]. Elle est induite suite à la reconnaissance du pathogène par les récepteurs TLR ou hélicases de l'immunité innée par des voies décrites ci-dessus. Les IFN de type I sont généralement produits en premier lieu sur le site de l'infection virale et ils agissent directement sur la cellule sécrétrice et dans les cellules voisines puis sont disséminés dans tout l'organisme par les cellules productrices.

Les IFN de type I se lient au récepteur de l'IFN- α appelé IFNAR, comportant deux sous unités IFNAR₁ et IFNAR₂. Ces sous unités interagissent avec TYK2 et JAK₁, deux membres de la famille des kinases JAK (*Janus-activated kinase*), lesquelles s'auto-phosphorylent et s'activent lors de l'engagement du récepteur IFNAR. L'activation de ces kinases aboutit ensuite à la phosphorylation des facteurs de transcription STAT (*signal transducer and activator of transcription*) 1 et/ou STAT2 entre autres qui s'associent en formant des complexes tels que l'homodimère STAT₁/STAT₁ ou le complexe trimérique STAT₁/STAT₂/IRF-9 également appelé ISGF-3 (*IFN-stimulated genes (ISG) factor 3*). Ces complexes se transloquent dans le noyau et initient ensuite la transcription en se liant à aux promoteurs des ISG. Les IFN induisent l'expression de certaines d'ISG différents qui sont responsables de diverses réponses. Différentes combinaisons de STAT peuvent être induites par les IFN de type I, et permettre la transcription de gènes ayant des fonctionnalités très différentes. De plus, la voie de signalisation JAK/STAT est également impliquée dans la régulation directe ou indirecte de nombreuses autres cascades moléculaires telles que les voies p38-MAPK et PI3K. Les IFN de type I peuvent ainsi induire de multiples cascades de signalisation qui s'entrecroisent aboutissant à des réponses variées et ceci permettant ainsi d'expliquer l'effet pléiotropique des IFN de type I.

⇒ *Activité antivirale des IFN de type I*

La réponse IFN- α/β aboutit à une réponse antivirale par la synthèse de protéines telles que Mx, PKR et OAS jouant un rôle respectivement dans la séquestration de ribonucléoprotéines virales, l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARN cellulaires et viraux. Des expériences *in vitro* ont démontré que LASV était sensible aux propriétés antivirales de l'IFN- α/β mais les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus. En effet, les IFN de type I recombinants inhibent la réplication de LASV dans les DC et macrophages [238]. De plus, il a été montré que la modeste sécrétion des IFN de type I par les macrophages joue un rôle dans le contrôle de la réplication virale.

⇒ *Sécrétion d'IFN- α/β Lors de l'infection par LASV et conséquences sur La modulation des réponses immunes et La pathogénèse*

Lors de l'infection par LASV, des taux d'IFN- α/β apparaissent très précocement chez les macaques survivants mais seulement tardivement chez les cas fatals [100, 103]. Les expériences *in vitro* ont montré que les DC et les macrophages infectés par LASV ne produisent que de très faibles quantités d'IFN- α/β [75]. A l'opposé, lors de l'infection par MOPV, des taux d'IFN- α/β sont sécrétés par les macrophages mais pas par les DC [217].

La réponse IFN de type I joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire par sa propre amplification, la différenciation et maturation des CPA, l'augmentation de l'expansion clonale et de la survie des lymphocytes T CD8+, l'orientation de la réponse adaptative vers un phénotype de type Th1 et l'activation des cellules NK. Les IFN de type I peuvent également avoir un rôle délétère. En effet, de fortes concentrations d'IFN de type I modulent négativement la réponse adaptative en inhibant par exemple la sécrétion d'IL-12 et la production d'IFN- γ par les cellules NK [239, 240]. Des expériences de neutralisation de l'IFN- α/β lors de l'infection *in vitro* de macrophages par MOPV ont montré que la réponse IFN de type I était en partie responsable de l'activation de ces cellules [217]. Ainsi, l'absence de production des IFN de type I par les CPA est probablement impliquée dans l'immunosuppression observée chez les cas sévères de fièvre de Lassa. De plus, la réponse IFN de type I est également impliqué dans la lymphopénie transitoire observée lors de la fièvre de Lassa.

Toutes ces observations démontrent que la réponse IFN de type I joue un rôle important dans la pathogénèse de la fièvre de Lassa. En effet, l'absence de production d'IFN- α/β par les CPA infectées empêche le contrôle de la réplication virale mais également la mise en place des réponses immunitaires adaptatives. De plus, la réponse IFN de type I pourrait être à l'origine de la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV.

- ***La réponse inflammatoire***

Lors de l'entrée de pathogènes dans l'organisme, une réponse inflammatoire locale se déclenche puis se généralise afin de stopper rapidement la dissémination et d'éliminer l'agent infectieux. La réponse inflammatoire se traduit par la dilatation vasculaire, l'augmentation de la perméabilité membranaire, l'infiltration de leucocytes dans les tissus et leur migration vers l'agent infectieux puis leur activation ainsi que la sécrétion de médiateurs inflammatoires.

Lors du stade précoce de l'inflammation, les produits issus de la coagulation participent à la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'attraction des monocytes et macrophages notamment. Ensuite, des cytokines et chemokines sont produites, permettant de

réguler l'inflammation. Les cytokines TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 ou certaines chemokines comme l'IL-8 (CXCL8) qui ont par exemple un rôle pro-inflammatoire, peuvent être produites lors de l'infection et intervenir dans l'inflammation.

Comme décrit précédemment, lors du stade précoce de la fièvre de Lassa, la réponse inflammatoire est caractérisée par l'apparition de fièvre. L'augmentation de la perméabilité membranaire est également observée chez les patients et les PNH infectés par LASV. D'après des données cliniques de patients infectés par LASV, le TNF- α n'est pas détecté dans le sérum quelle que soit l'issue de la maladie. Les chemokines IL-8 et CXCL10 sont sécrétées chez les patients survivants de la fièvre de Lassa alors que ce n'est pas le cas chez les malades qui décèdent [78]. Lors de l'infection expérimentale de PNH, il n'y a pas de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires à l'exception de l'IL-6 qui est uniquement détecté chez les animaux morts. Des taux élevés de messagers codant les chemokines CXCL10 et CXCL11 sont présents dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et les ganglions lymphatiques chez tous les animaux infectés [100, 103]. Les études *in vitro* montrent que les DC et les macrophages infectés par LASV ne produisent pas de médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 β , IL-6 ou IL-8 [74, 75, 215]. Les DC ne sécrètent pas non plus les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β , ni l'IFN- γ ou l'IL-12 impliquées dans la régulation de la réponse adaptative. Les DC infectées produisent également des quantités modérées de CCL3 et CCL4 [74, 75]. A l'opposé, des résultats obtenus au laboratoire montrent que l'infection *in vitro* de macrophages par MOPV induit la sécrétion de grandes quantités de CXCL9 (Mig), CXCL10 et CXCL11 (I-Tac) [Pannetier, et al., manuscrit en préparation].

Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude comparée de l'infection de macaques par les souches virulentes LCMV-WE et atténuée LCMV-Armstrong ainsi qu'avec le modèle cobaye infecté par les variants virulent P18 et atténué P2 de PICV. L'analyse d'échantillons de sang de singes infectés par LCMV-WE montre une absence de production de TNF- α et IL-1 β et une très faible production d'IL-8, CCL2 (MCP-1) et CXCL10 [241]. L'infection intrapéritonéale par PICV virulent aboutit à une augmentation de la transcription de CCL2 par les cellules cibles péritonéales au début de l'infection et à une diminution des ARNm codant et IL-8 [242]. Au stade tardif de l'infection, on note toujours une diminution des ARNm codant TNF- α par les lymphocytes du sang périphérique (PBL) par rapport aux animaux infectés par le variant atténué.

La réponse adaptative

- *La réponse humorale*

La réponse humorale est spécifique de l'antigène et aboutit à la production d'anticorps ou immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B. Les anticorps sont produits dans les organes lymphoïdes secondaires vont ensuite dans le sang où ils sont disséminés dans tout l'organisme. Les Ig reconnaissent une partie spécifique de l'antigène appelé épitope. L'association Ig/antigène aboutit à la formation d'un complexe immun qui est reconnu par les macrophages et autres cellules phagocytes possédant un récepteur au fragment constant (Fc) des Ig. Ce processus aboutit par la suite à la phagocytose et à la destruction directe du pathogène ou de la cellule infectée. Les complexes anticorps/antigène activent également le système du complément aboutissant à la destruction directe ou l'opsonisation des cellules. Les anticorps peuvent également neutraliser directement le pouvoir infectieux du pathogène en empêchant, par exemple, l'attachement du virus à la cellule cible, on les appelle anticorps neutralisants.

- *Sécrétion d'anticorps*

Lors de l'infection par LASV, de fort taux d'anticorps IgG et IgM sont détectés dans le sang des patients et également chez les PNH. La réponse humorale se met en place dès la première semaine suivant l'infection [69, 100, 102, 243, 244]. Les IgM chez les survivants persistent plusieurs mois après l'infection [245]. Les anticorps IgG détectés dans le sérum des patients et des PNH survivants sont spécifiques des protéines NP, GP1, GP2 et Z du virus [100, 246].

- *Essais de traitement par injection de sérum immun*

En 1969, lorsqu'un agent de laboratoire s'est infecté en travaillant avec les premiers échantillons ramenés du Nigéria, il a été traité avec succès avec du plasma contenant des fort taux d'anticorps d'un patient ayant survécu lors de l'épidémie de Jos [32]. Le sérum de ce survivant a également été donné à plusieurs reprises entre 1970 et 1976 mais les essais ont été peu concluants car à peine plus de la moitié des patients seulement ont survécu.

Plus tard, un nouvel essai de traitement de malades au Nigéria avec le sérum de patients convalescents a été effectué. La totalité des malades ont survécu lorsque l'administration du sérum était faite dans les 10 jours suivants l'hospitalisation. Au contraire, lorsque le sérum a été administré après le 10^{ème} jour, plus de la moitié des patients sont décédés. L'efficacité de l'administration de sérum immun reste discutable car lors de cette expérience la grande majorité des malades avait survécu sans même aucune administration de sérum immun [247]. D'autres essais en Sierra Leone

ont confirmé que l'administration du plasma provenant de patients survivants de la fièvre de Lassa n'améliorait pas la survie [179].

L'infection expérimentale par LASV dans des modèles animaux a confirmé que le traitement de la fièvre de Lassa par du sérum immun était peu efficace. En effet, du plasma immun issu de cobayes, de singes et d'humains survivants de la fièvre de Lassa a guéri des cobayes S13 infectés par LASV seulement si le taux d'anticorps neutralisants était important [248]. De plus, des singes cynomolgus infectés expérimentalement par LASV puis traités avec du sérum immun de singe ont survécu uniquement si l'administration du sérum était précoce [98]. La survie des PNH infectés par LASV était également entièrement corrélée avec le taux d'anticorps neutralisants contenus dans le sérum immun.

De plus, l'origine géographique du plasma est un facteur important. Ainsi, le plasma provenant de patients du Libéria est plus efficace pour traiter les infections par des souches originaires du Libéria [249]. Des essais de sélection de sérum immun avec de fort taux d'anticorps neutralisants sont très difficiles et peu concluants. En effet, les patients convalescents ne possèdent souvent que pas ou de très faibles taux d'anticorps neutralisants et il est difficile de trouver des sérums immuns ayant la même origine géographique que les malades à traiter [249]. La dose d'anticorps neutralisants contenus dans le plasma immun est également un facteur crucial pour le traitement d'autre FH comme l'infection par JUNV [250]. Or, l'infection par LASV n'induit pas ou uniquement des quantités très faibles d'anticorps neutralisants chez l'homme ou les PNH [100, 249, 251]. L'absence de forts taux d'anticorps neutralisants pourrait s'expliquer par la destruction des lymphocytes B par les cellules T spécifiques comme lors de l'infection par LCMV cependant cette hypothèse reste controversée [252].

Conformément aux essais de traitement chez l'homme et le PNH par du sérum immun, les essais vaccinaux ont démontré que la présence d'anticorps ne suffisait pas à l'élimination du virus et ainsi que la création d'un vaccin ne devait pas uniquement cibler l'induction d'une réponse humorale. En effet, bien que l'apparition d'anticorps soit plus précoce chez les survivants, elle n'est pas corrélée avec l'issue de la maladie [100, 102]. Lors d'essais vaccinaux chez le cobaye, il est apparu que les NP et GP de LASV étaient immunogènes et permettaient le développement d'une réponse immunitaire protectrice mais les taux d'anticorps détectés chez les animaux n'étaient pas corrélés avec la survie [253]. Des PNH vaccinés avec du LASV inactivé secrètent également un taux élevé d'anticorps mais cette réponse n'est pas suffisante pour les protéger [254].

De plus, des expériences ont montré qu'à faible dose, le sérum immun pouvait induire l'augmentation de la réplication virale dans la lignée monocyttaire U937 [255]. Cette méthode de

traitement par du sérum immun reste ainsi très limitée de par la nécessité d'un taux élevé d'anticorps neutralisants, d'une proximité géographique et d'une administration précoce.

- *La réponse T*

Lors de l'infection virale, les antigènes sont capturés puis clivés par les CPA et les peptides résultants sont associés aux molécules du CMH de classe I et II et présentés aux lymphocytes T respectivement CD8+ et CD4+ pour initier les réponses adaptatives [219]. L'activation des cellules T passe ainsi par la reconnaissance du complexe CMH/peptide à la surface des CPA par les cellules T spécifiques de l'antigène mais également par l'interaction avec des molécules de costimulation à la surface des DC. L'activation des lymphocytes T induit la prolifération clonale des cellules T spécifiques de l'antigène, l'induction de cellules T CD8+ cytotoxiques, la production de cytokines telles que IFN- γ ainsi que le développement d'une réponse mémoire T CD4+ et CD8+. En retour, les cellules T peuvent activer les DC induisant l'augmentation de l'expression des molécules CD80, CD86 et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-12, IL-15 et IL-18.

- *Activation des cellules T*

Les premières études *in vivo* chez l'homme et le PNH suggèrent que les lymphocytes T jouent un rôle crucial dans l'issue de la maladie. L'infection sévère par LASV semble être associée à une réponse T déficiente. Chez le PNH, un dysfonctionnement des lymphocytes T en réponse à la stimulation par différents mitogènes a été observé dans les cas fatals [102]. Une lymphopénie transitoire survient chez les patients et les PNH lors de la phase aiguë de la fièvre de Lassa, ainsi qu'une déplétion des lymphocytes de la rate et des ganglions lymphatiques et une modification de l'architecture folliculaire des ganglions lymphatiques [77, 95]. Des observations chez le PNH ont montré que LASV se réplique dans les fibroblastes réticulaires des organes lymphoïdes secondaires et interfèrent avec la capacité de ces cellules de soutenir l'architecture des zones T et de sécréter des molécules solubles importante pour l'homéostasie des lymphocytes T [256].

De plus, les patients qui survivent possèdent des fortes concentrations sériques d'IL-8 et CXCL10, deux chemokines impliquées dans l'attraction des lymphocytes T alors qu'elles ne sont détectées qu'à faible dose dans les cas fatals [78]. Cette observation suggère ainsi que la réponse médiée par les lymphocytes T pourrait être impliquée dans le contrôle de l'infection. D'autres études ont démontré que l'infection fatale de singes cynomolgus par LASV était associée à l'absence d'activation des cellules T du sang périphérique et l'absence de cytokines T. Chez les PNH, le contrôle de la maladie est corrélé avec la circulation de cellules T CD4+ et CD8+ activées très tôt après l'infection, lesquelles se multiplient par la suite [100]. Ces résultats suggèrent alors que les

infections peu sévères par LASV ou asymptomatiques pourraient être associées à l'activation des cellules T.

Dans un modèle *in vitro*, il a été montré que les DC humaines infectées par LASV n'activent pas les cellules T CD4+ et CD8+ [74, 257]. Les réponses T induites sont faibles et retardées, les lymphocytes ne prolifèrent pas et ne permettent pas de contrôler la réplication virale [257]. L'infection par LASV n'induit pas non plus le développement de cellules T mémoires. L'absence de prolifération des lymphocytes T lors de la stimulation par des DC infectées par LASV a également été montrée dans des expériences de réaction lymphocytaire mixte [74]. L'absence d'induction de lymphocytes cytotoxiques spécifiques *in vitro* est également corrélée avec les observations réalisées lors d'essais vaccinaux. En effet, il a été montré qu'un vaccin ciblant les réponses T CD8+ cytotoxiques permettait de contrôler l'infection par LASV [258].

Afin de caractériser la réponse cellulaire mémoire lors de la fièvre de Lassa, des études chez les patients ayant survécu ont été effectuées. Les PBMC ainsi isolés chez ces individus prolifèrent en réponse à la NP recombinante [259]. Des clones de lymphocytes T spécifique de la NP ont ainsi été générés à partir de ces PBMC et les épitopes spécifiques ont été étudiés et comparés avec d'autres souches de LASV. Cette étude démontre que les patients convalescents possèdent une forte réponse mémoire T CD4+ contre la NP de LASV mais plus ou moins spécifique de la souche virale.

De plus, il apparaît que l'immunité croisée entre LASV et LCMV est médiée par les lymphocytes T CD4+ spécifiques de la GP [260]. En effet, des souris vaccinées par un virus recombinant exprimant la GP de LASV survivent à l'infection par LCMV grâce une réponse T CD4+ alors qu'aucune réponse anticorps ni cytotoxique n'a été détectée. De plus, le transfert adoptif de ces clones T CD4+ spécifique de la GP de LASV permet la survie d'autres souris infectées par LCMV. Cette étude démontre que d'une part la réponse T CD4+ est probablement importante dans le contrôle de l'infection par LASV et que d'autre part, elle est mise en jeu lors du développement d'une immunité croisée.

A l'opposé, les observations microscopiques de coculture de cellules T avec des DC infectées par MOPV ont montré que ces cellules T entraînent en contact et se regroupaient autour des DC infectées [257]. Ces résultats suggèrent l'existence d'un dialogue entre ces deux populations lors de l'infection par MOPV conduisant à l'activation réciproque des cellules T et des DC. En effet, les lymphocytes T sont fortement activés en présence de DC infectées par MOPV. De plus, les DC infectées par MOPV sécrètent de fortes quantités d'IFN- α/β , d'IL-12 et de CXCL10, favorisant probablement l'activation de ces cellules T. Les cellules T CD4+ et CD8+ stimulées par les DC infectées prolifèrent, acquièrent des phénotypes mémoires et se différencient en cellules

cytotoxiques capables de contrôler l'infection virale. Contrairement à LASV, l'infection par MOPV induit une forte réponse T conduisant au contrôle de l'infection. La différence de pathogénicité entre LASV et MOPV semble ainsi être associée au développement des réponses T.

– Rôle dans la pathogenèse

L'absence d'activation des réponses T lors de la fièvre de Lassa peut s'expliquer par l'absence d'activation et la maturation des DC lors de l'infection. Elle pourrait aussi survenir après le changement structurel des organes lymphoïdes ou être le résultat d'une suppression active de l'immunogénicité par le virus lui-même. En effet, la maturation expérimentale des DC infectées par LASV par du TNF- α ou de l'IL-1 β ne permet pas l'induction de réponses T efficaces [257].

Les cellules T peuvent être également associées à des événements immunopathologiques. En effet, il a été récemment montré qu'elles étaient impliquées dans les réponses inflammatoires innées délétères et dans la pathogenèse dans un modèle de souris humanisées infectées par LASV [89]. Dans ce modèle, les interactions entre les monocytes/macrophages et les lymphocytes T aboutissent à une stimulation exacerbée des macrophages et à une modification des compartiments spléniques et à des dommages hépatiques et pulmonaires. Ces données s'accordent également avec le rôle des cellules T dans la pathogenèse lors de l'infection par LCMV [261]. Cependant, d'autres investigations chez le PNH sont requises afin de montrer si des événements immunopathologiques impliquant les cellules T surviennent lors de la fièvre de Lassa.

Les données disponibles chez l'homme et le PNH concernant les réponses mises en place lors de la fièvre de Lassa sont résumées dans le tableau IV et celles obtenues dans des modèles *in vitro* sont résumées dans la figure 13.

Tableau IV. Réponses immunitaires innée et adaptative développées lors de l'infection par LASV. Ces données ont été obtenues lors d'études chez des patients et des PNH infectés par LASV en fonction de l'issue de la maladie.

		Issue de la maladie	
		SURVIE	MORT
Réponses inflammatoires	Monocytes CD80+ circulants	+++	+
	IFN- α	Précoce et transitoire	Retardée
	Cytokines inflammatoires	-	- (sauf IL-6 tardive)
	Chemokines	ARNm CXCL10, CXCL11 CCL2, eotaxine?	ARNm CXCL10, CXCL11 CCL2, eotaxine
Réponse humorale	IgG/IgM	+++	+++
	Anticorps neutralisants	-	-
Réponse des cellules NK	Déplétion des cellules	Transitoire	+++
Réponse des lymphocytes T	Lymphopénie	Transitoire	+++
	Cytokines dérivées	-	-
	Activation des cellules T CD4+ et CD8+	Forte et précoce	Faible et retardée
	Prolifération <i>in vitro</i> en réponse au virus	+	-

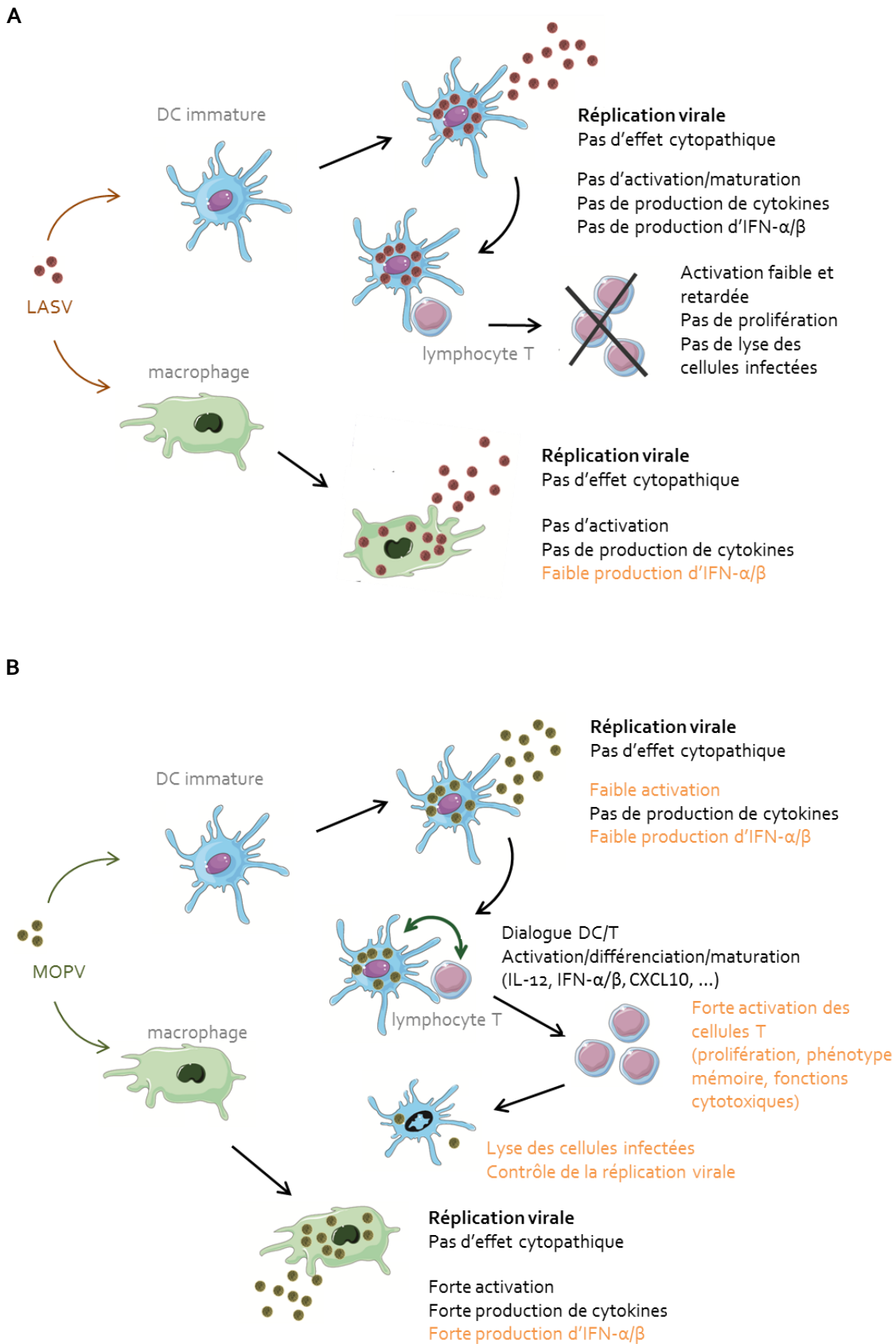


Figure 13. Comparaison des réponses immunes induites *in vitro* lors de l'infection de DC et macrophages par LASV (A) et MOPV (B). Adapté de [262].

Vers un vaccin ?

Les premières expériences de vaccination avec des PNH ont été faites avec du LASV inactivé par irradiation gamma [254]. Malgré des forts taux d'anticorps détectés, les animaux vaccinés n'ont pas survécu à l'infection et ont développé une pathologie avec notamment un dysfonctionnement de la coagulation et une élévation des taux d'enzymes hépatiques. De nombreuses autres approches vaccinales anti-LASV basées sur plusieurs systèmes ont été testés [263] et sont décrites ci-dessous.

– Vecteur arénavirus

⇒ *Utilisation de MOPV*

D'autres essais vaccinaux ont été effectués en utilisant MOPV car il est proche de LASV mais non pathogène. La vaccination avec MOPV s'est alors révélée très prometteuse car elle protégeait des macaques rhésus de l'infection par LASV [97, 243]. Cependant l'utilisation d'un virus entier infectieux reste controversée, pose de nombreux problèmes de sécurité sanitaire et ainsi n'est pas envisageable en tant qu'approche vaccinale à grand échelle.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le segment L de LASV serait responsable de la virulence comme celui de PICV [264], des virus réassortants ont été obtenus par coinfection avec LASV et MOPV. Un de ces variants atténué portant le segment S de LASV et le segment L de MOPV a été isolé et appelé clone ML29 [87]. Le clone ML29 a été séquencé afin de comparer le génome de ce réassortant avec les segments initiaux de LASV et MOPV [210]. Les données ont mis en évidence plusieurs mutations qui pourraient affecter la stabilité génétique et l'efficacité de réplication. Une substitution était présente dans la région C-terminale de la NP, une autre entre le site de clivage de la GPC et le peptide de fusion de la GP2 et 3 autres mutations étaient situées aux extrémités non codantes des segments (deux mutations à l'extrémité du segment L et une à l'extrémité 3' du segment S).

Le potentiel du clone ML29 comme candidat vaccin a ensuite été testé dans des modèles animaux [87]. La réplication virale du clone ML29 a été atténuée chez le cobaye et le PNH. Des souris CBA infectées par LASV par injection intracrânienne puis traitées par transfert adoptif de splénocytes de souris vaccinées par le clone ML29 ont développé une immunité cellulaire protectrice, probablement médiée par les cellules T cytotoxiques [258]. Enfin, alors que toutes les souris non traitées sont mortes, celles ayant reçus des splénocytes provenant de souris vaccinées ont survécu sans signe de maladie, ni lésion histologique. Ce candidat vaccin ML29 s'est répliqué également faiblement et sans toxicité apparente chez les macaques rhésus. De plus, les PNH vaccinés ont développé des cellules T spécifiques capables de produire de l'IFN- γ lors d'une infection *in vitro* avec

des virus réassortants LASV/MOPV mais aussi en réponse à d'autres antigènes proches de LASV (MOPV et LCMV). ML29 ne s'est pas non plus avéré toxique chez les marmousets et une virémie uniquement transitoire a été observée [265]. La vaccination par le clone ML29 a protégé les marmousets de la mort induite par LASV. Les animaux n'ont montré aucun signe clinique et ont développé une immunité cellulaire.

Cependant, malgré l'efficacité de ce candidat vaccin et l'absence de toxicité, les animaux vaccinés ont présenté une virémie et ainsi, une approche vaccinale chez l'homme ne peut être envisagée.

⇒ *Vaccins recombinants LCMV*

Grace à la génétique inverse, des LCMV recombinants portant par exemple la GP des sérotypes Indiana et New Jersey de VSV à la place de la GP de LCMV ont été créés [172, 266]. L'échange des GP a permis la création de vaccins atténués n'induisant pas de pathologie mais une immunité chez la souris avec le développement d'anticorps neutralisants et une réponse T cytotoxique mémoire spécifique du virus LCMV. Cette approche pourrait être envisagée pour la création d'un vaccin anti-LASV.

Récemment, un LCMV recombinant comportant un segment L et deux segments S a été généré [267]. Chacun de ces segments S encode un gène viral et un gène d'intérêt additionnel. Cette construction est apparue stable et possède les mêmes propriétés que LCMV sauvage. Un virus LCMV trisegmenté dont les deux gènes d'intérêt codent la GFP est atténué *in vivo* chez la souris et de plus, il protège les animaux de l'infection par LCMV sauvage. La présence de deux gènes additionnels rend possible la création d'un vaccin multivalent prometteur.

⇒ *Un vaccin recombinant JUNV/LASV*

Dans le début des années 1980, un vaccin atténué contre JUNV appelé Candid#1 a été construit [268]. Par la suite, il s'est avéré sans danger et efficace et a déjà été administré à plus de 200 000 personnes en Argentine.

A partir de ce vecteur JUNV Candid#1 et grâce à la génétique inverse, il a été possible de construire d'autres candidats vaccins contre LASV, exprimant soit la GPC entière de LASV, soit une chimère JUNV/LASV où certains domaines des GP1 et GP2 de JUNV sont remplacés par ceux de LASV [269]. Il a ainsi été montré que les régions transmembranaire et cytoplasmique de la GP2 ainsi que du SSP appartenant à un même virus étaient nécessaires pour la maturation de la GP et la production de virus chimériques infectieux. Enfin, l'échange de la GPC entière ou de l'ectodomaine GP1/GP2 LASV

à la place de celui de JUNV au sein du vaccin Candid#1 a abouti à un phénotype atténué chez la souris. Ces résultats sont ainsi prometteurs pour la création d'un vaccin bivalent JUNV/LASV.

– Vecteurs ADN

⇒ *Les vaccins réplicatifs*

Les premiers vaccins utilisés contre LASV étaient basés sur le virus de la vaccine (VACV). Ainsi, des virus recombinants VACV portant soit le gène de la NP de LASV, soit le gène de la GP ont été testés chez le cobaye. Les animaux étaient protégés mais ont développé de la fièvre et étaient virémiques. Ces travaux ont cependant apporté la première démonstration que la NP et la GP étaient capables d'éliciter une réponse immune protectrice [253, 270, 271]. Le VACV recombinant portant la GP de LASV protégeait également les singes rhésus de l'infection par LASV. Les animaux toutefois ont développé quelques signes cliniques et une virémie faible et transitoire, ainsi que des anticorps spécifiques [272]. Plus tard, des vaccins recombinants VACV exprimant différentes protéines structurales de LASV (NP, GP₁, GP₂), seules ou en combinaison ont été testés à grande échelle sur des singes rhésus et cynomolgus [273]. L'immunisation par le vaccin exprimant une combinaison des protéines NP, GP₁ et GP₂ était presque totale. Une grande majorité des animaux immunisés avec un vaccin VACV portant la GPC de LASV ont survécu à l'infection sans développer d'anticorps. A l'opposé, seulement quelques singes ayant reçu un vaccin VACV exprimant la NP de LASV ont survécu à l'infection, et ce malgré la présence d'anticorps. Les singes immunisés avec un vaccin VACV exprimant une seule des deux GP ne survivaient pas à l'infection alors que ceux immunisés avec deux vaccins séparément, chacun exprimant l'une des GP ont survécu. Cette étude a montré d'une part que la NP était peu immunogène et d'autre part, que la présence concomitante des GP₁ et GP₂ était cruciale pour le développement d'une immunité. Ces travaux ont également confirmé que la production d'anticorps n'était pas corrélée à la survie des animaux et que la confection d'un vaccin anti-LASV ne devait pas se baser sur l'induction des réponses humorales.

Un autre candidat vaccin était basé sur VSV dont le gène codant la GP a été remplacé par celui de la GPC de LASV [274]. Des macaques cynomolgus ayant reçu en intramusculaire ce vaccin étaient protégés de l'infection létale par LASV [275]. Ce vaccin n'est pas toxique et seule une virémie transitoire a été observée. Les quatre singes immunisés par ce vaccin puis infectés par LASV ont survécu et ont développé une réponse humorale mais présentaient de faible taux d'anticorps neutralisants. Pour trois d'entre eux, une réponse cellulaire a été élicitée avec une production de TNF- α et d'IFN- γ par les cellules T CD₄⁺ et CD₈⁺. Un vaccin VSV recombinant apparaît intéressant car il peut être administré simplement par voie cutanéomuqueuse et de plus, il n'existe pas ou peu d'immunité anti-VSV car l'infection est très rare.

Le vaccin atténué 17D de la fièvre jaune (YF-17D), déjà utilisé pour vacciner des millions de personnes depuis plus de 70 ans, a également servi de vecteur pour construire un vaccin contre LASV. Des vaccins portant soit le gène de la GPC de LASV, soit directement les inserts des GP1 et GP2 ont été construits. Ces vaccins chimériques exprimaient à la fois les GP1 et GP2 de LASV mais aussi les GP du virus de la fièvre jaune et permettaient le développement d'anticorps dirigés contre ces deux virus [276, 277]. Ces vaccins se répliquent faiblement chez le cobaye S₁₃ et une seule injection est suffisante pour protéger les animaux de l'infection par LASV. Cependant, ces constructions vaccinales sont instables au fil des passages en culture cellulaire.

Bien qu'apportant des données intéressantes, ces dernières approches basées sur des vaccins réplikatifs (VACV, VSV ou fièvre jaune) ne sont encore pas applicables à l'homme notamment à cause aux nombreuses questions de sûreté encore présentes.

⇒ *Les vaccins non réplikatifs*

Des vaccins ont été créés à partir d'un système ARN réplicon dérivé d'une souche atténuée du virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV) [278]. Ces particules virales ont été obtenues après la transfection de cellules par des ARN issus d'un ADNc codant la réplicase du virus VEEV, et les gènes NP et/ou GPC de LASV, et de deux autres ADNc codant chacun les protéines de l'enveloppe et de la capsid du virus VEEV importantes pour la formation des particules virales. D'autres vaccins VEEV bivalents LASV/EBOV portant la GPC de LASV et la GP du virus EBOV ont été créés sur ce modèle. Des cobayes S₁₃ vaccinés par ces vaccins ont été protégés lors de l'infection par LASV, sans présenter aucun signe de maladie mais certains sont néanmoins devenus virémiques. Ces vaccins n'ont pas été testés chez les PNH mais les essais réalisés avec des vaccins VEEV contre EBOV suggéraient que ce système ne permettait pas de conférer une véritable protection immunitaire.

Des pseudo-particules ou VLP, qui ont la même morphologie que LASV mais ne sont pas infectieuses, peuvent également servir à la création d'un candidat vaccin anti-LASV [279]. Elles sont obtenues après transfection de cellules avec des plasmides exprimant le gène de la protéine Z de LASV, essentielle pour permettre le bourgeonnement des particules virales, et des combinaisons des gènes GPC et NP. Les VLP exprimant la GPC de LASV et celles portant une combinaison de la GPC et de la NP sont immunogènes chez les souris et permettent le développement d'une réponse anticorps mais leur efficacité n'a pas été testé chez le PNH.

⇒ *Autres systèmes*

Un des systèmes de vaccin basés sur un vecteur ADN les plus simples est encore un plasmide portant le gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases des cellules

de mammifères. Ce système est déjà utilisé lors de thérapie génique. Certaines techniques d'électroporation ou de « *gene gun* » se sont avérées efficaces pour permettre le transport du matériel ADN dans les cellules cibles de l'animal et ainsi éliciter une réponse immunitaire. Un candidat vaccin ADN portant la NP de LASV a protégé des souris de l'infection par les Arénavirus LCMV et PICV et a permis le développement de fortes réponses T CD8+ [280]. Un autre vaccin ADN exprimant le gène de la GPC de LASV, construit récemment, semble prometteur puisqu'il a conféré une immunité à des cobayes et singes cynomolgus après transmission par électroporation intradermique [281].

Un vaccin ADN recombinant basé sur le vecteur *Salmonella typhimurium* atténué et exprimant la NP de LASV a été créé [282]. Des souris vaccinées ont développé des cellules T cytotoxiques spécifiques de LASV qui lysaient *in vitro* des cellules infectées par LCMV. Ce vaccin *Salmonella* est également efficace *in vivo* lors de l'infection de souris par LCMV [283]. Cependant, ces travaux sont discutables car la NP de LASV ne constitue pas un bon immunogène, même dans un autre système comme le vecteur VACV, et seulement un tiers des animaux survivaient lors de l'infection par LCMV.

– Conclusion : quelles méthodes pour un vaccin efficace ?

La protection contre le virus Lassa dépend de l'induction d'une immunité cellulaire T [273, 275]. L'identification d'un épitope viral immunogène est alors primordiale pour la création d'un vaccin.

Les études chez l'homme, les essais vaccinaux chez le PNH et les modèles prédictifs suggèrent que les antigènes viraux principaux reconnus par les cellules T sont probablement la NP et la GP [259, 273, 275]. Des alignements de séquences ont montré qu'il existe un domaine de la NP (acides aminés entre 118 et 126 sur la séquence de LCMV) qui est non seulement fortement conservé entre les Arénavirus de l'ancien monde et de plus, se lie à l'épitope de la plupart des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques des souris H2d [284]. D'autres travaux ont montré que la GP2 de LASV contenait un épitope spécifique des lymphocytes T CD4+ conservé entre toutes les souches de LASV mais aussi entre les Arénavirus de l'ancien et du nouveau monde (clade B) [285]. L'identification des épitopes T CD8+ restreints au CMH de classe I est primordiale pour la création d'un vaccin induisant des réponses T cytotoxiques.

De nombreuses questions concernant le choix de la bonne combinaison dans la création d'un vaccin anti-LASV restent en suspens. Certains se sont attachés à essayer de créer un vaccin multivalent Arénavirus, contre LCMV, LASV, JUNV, et les virus Guanarito, Machupo, Sabia et Whitewater Arroyo. Cette approche suppose que les épitopes T CD8+ sont conservés pour tous ces virus. Une expérience basée sur l'infection de souris HLA-transgéniques par des VSV recombinants a permis

d'identifier des épitopes HLA-A02 et HLA-A03 du CMH de classe I, conservés pour ces Arénavirus et qui sont apprêtés par les CPA pour initier la réponse T cytotoxique [286]. L'immunisation des souris HLA-transgéniques par ces épitopes a permis le développement de réponses T CD8+ qui croisaient pour ces Arénavirus. Ce vaccin pourrait être efficace pour protéger de l'infection par chacun de ces Arénavirus. Ce même modèle a également permis l'identification de 37 épitopes HLA-DRB1 du CMH de classe II, pour induire la réponse T CD4+ [287].

A ce jour, malgré des approches encourageantes, il n'existe aucun vaccin homologué contre LASV. Seule la ribavirine est utilisée, lorsque c'est possible, pour le traitement de la fièvre de Lassa. De nombreuses thérapies et candidats vaccins ont déjà été testés et certains apportent des résultats plutôt encourageants.

Un autre virus responsable de FH : le virus Ebola

Aspects moléculaires

- *Morphologie et organisation du génome*

EBOV est un Ebolavirus de la famille des Filoviridae appartenant à l'ordre des Mononegavirales. Comme LASV, c'est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité négative mais son génome est non segmenté [288]. La morphologie filamenteuse des particules virales a donné son nom à cette famille de virus à partir du latin *filum*. Le diamètre des virions est de l'ordre de 80 nm et la longueur peut atteindre 14 000 nm. Le génome code pour 7 protéines dans le sens 3' vers 5' : la NP, la protéine du virion (VP) VP35, la VP40, la GP, la VP30, la VP24 et une polymérase ARN ARN-dépendante L. Le génome viral comporte des séquences *Leader* et *Trailer* aux extrémités 3' et 5' respectivement qui ont un rôle dans la réplication, la transcription et l'encapsidation. Comme pour LASV, ces séquences comportent des motifs consensus conservés parmi les autres Ebolavirus. Elles peuvent s'associer et former une structure secondaire en épingle à cheveux. Les séquences des gènes encodés par le génome d'EBOV sont séparées soit par des régions intergéniques soit par des zones de chevauchements. L'ARN est encapsidé par la NP et associé aux protéines VP35, VP30 et L pour former le complexe RNP. Ce complexe est ensuite attaché à l'enveloppe virale par les protéines de matrice VP24 et VP40. La GP s'associe en trimères pour former des projections à la surface des virions. En plus de leur rôle structural, les protéines d'EBOV ont des fonctions multiples décrites ci-dessous. Un schéma de la structure des particules virales et de l'organisation du génome est présenté dans la figure 14.

- *Les protéines des Ebolavirus et leurs fonctions*

- ⇒ *Le complexe RNP*

Les protéines NP, VP35, VP30 et L jouent un rôle fondamental dans la formation des complexes RNP et dans la transcription et la réplication virale.

La NP est encodée par l'extrémité 3' du génome. C'est une protéine de 739 acides aminés qui peut être phosphorylée. La VP35 est une protéine de 35 kDa, constituée de 321 acides aminés. Elle se lie à l'ARN au sein des nucléocapsides et peut également former des homo-oligomères. La VP35 joue également un rôle fondamental dans l'inhibition de la réponse antivirale et de la réponse IFN, lequel sera détaillé dans la partie suivante. La VP30 est une protéine phosphorylée de 288 acides aminés

de 32 kDa qui a peu d'analogues parmi les protéines des autres Mononegavirales. Elle peut former des homo-oligomères et interagir aussi avec la NP au sein des complexes RNP.

Le gène L encode une grosse protéine fortement conservée de 2212 acides aminés (252,2 kDa). C'est une ARN polymérase ARN-dépendante similaire à la protéine L de LASV et des autres polymérases des virus à ARN simple brin de polarité négative, qui permet la réplication et la transcription du génome virale. Elle est aussi responsable de la polyadénylation des ARNm et de l'édition de la GP.

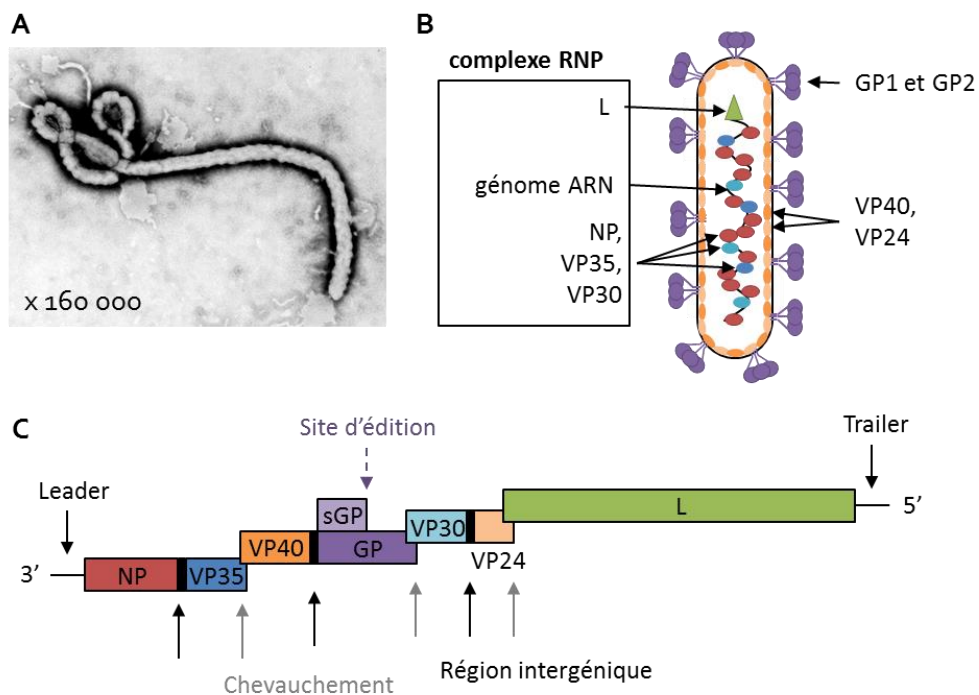


Figure 14. A. Première photographie d'EBOV dans une culture cellulaire obtenue par microscopie électronique en 1976 (Murphy FA, CDC). Organisation des particules virales (B) et du génome (C) d'EBOV. D'après [288].

⇒ Les protéines de matrice VP40 et VP24

Le cadre de lecture de la VP40 d'EBOV chevauche celui de la VP35 et la VP40 est transcrite en retard par rapport à la VP35. C'est une protéine de 35 kDa, constituée de 326 acides aminés, la plus conservée de tous les gènes et la plus abondante des virions. Comme la protéine Z de LASV, la protéine VP40 est une protéine de matrice et elle permet le bourgeonnement des particules virales [289]. La VP40 possède des domaines tardifs impliqués dans cette étape du relargage des VLP et virions. La VP40 s'associe à la GP à la membrane cellulaire par son extrémité C-terminale par des interactions hydrophobiques au sein de radeaux lipidiques, lesquels facilitent les interactions

protéines/protéines et protéines/lipides, le bourgeonnement et l'entrée des virus. La VP40 seule est suffisante pour le transport de la nucléocapside à la membrane plasmique par le biais des interactions avec le réseau des microtubules.

La protéine VP24 est constituée de 251 acides aminés (28,3 kDa). Elle joue un rôle structural de matrice et s'associe à la membrane plasmique comme VP40, mais ne semble pourtant pas interagir directement avec cette dernière. Plusieurs études suggèrent que la VP24 n'est pas impliqué dans le bourgeonnement des particules virales, ni dans l'entrée dans la cellule cible mais pourrait participer à l'assemblage des nucléocapsides à l'intérieur des cellules infectées. Elle interagit avec la NP et joue un rôle suppresseur dans la réplication et la transcription virale. Comme la VP35, la VP24 interfère aussi avec la réponse IFN et le mécanisme sera décrit dans la partie suivante.

⇒ La GP

Le gène de la GP d'EBOV présente un site d'édition qui permet la traduction de trois polypeptides différents. Le premier est une protéine structurale qui est d'abord traduite en tant que précurseur de façon similaire à la GPC de LASV. Elle est ensuite clivée en deux sous-unités GP1 et GP2 par une proprotéine convertase furine, lesquelles s'associent pour former des hétérotrimères à la surface des cellules. La GP2 d'EBOV possède le domaine transmembranaire nécessaire à l'ancrage à la membrane et aussi un peptide de fusion important pour l'entrée du virus. Le gène encode également deux formes non structurales de GP par édition, qui sont solubles et sécrétées en grande quantité par les cellules infectées car elles ne possèdent pas de domaine transmembranaire. Une forme de 324 acides aminés est sécrétée en homodimère après clivage d'un petit peptide soluble également à l'extrémité C-terminale. Une autre forme secondaire monomérique est directement sécrétée. Toutes les formes de GP partagent 295 acides aminés. Il est à noter que les hétérodimères GP1/GP2 peuvent également être sécrétés de façon similaire à ce qui est observé pour LASV, après clivage de l'ectodomaine de surface par une sheddase de la famille des métalloprotéases [290]. La GP d'EBOV joue de façon certaine un rôle dans la pathogenèse de la FH Ebola, lequel sera décrit dans la partie suivante.

• Le cycle viral

Le cycle viral d'EBOV est similaire à ceux de la plupart des virus à ARN simple brin de polarité négative. Après la liaison avec un récepteur, le virus entre dans la cellule par endocytose et/ou fusion directe avec la membrane plasmique. Le génome viral est relargué dans le cytoplasme de la cellule, dénudé par les nucléocapsides puis transcrit et répliqué. Les ARNm sont traduits, les protéines s'associent pour former les complexes RNP avec l'ARN génomique, puis avec les protéines

de matrice et les GP. Les particules virales bourgeonnent à la surface des cellules infectées et sont libérées.

Le mécanisme d'entrée d'EBOV est constamment rediscuté. Il s'attache à la cellule cible par des lectines ou d'autres molécules. EBOV est endocyté dans des vésicules recouvertes de clathrine ou peut également entrer dans la cellule par un mécanisme de macropinocytose. Il est ensuite transporté jusqu'aux endosomes acides par les microtubules et les microfilaments, puis fusionne avec la membrane endosomale. De façon similaire à LASV, le mécanisme de fusion de l'enveloppe d'EBOV avec les membranes de la cellule infectée est médié par la GP2 et son peptide de fusion. L'enveloppe virale peut aussi directement fusionner avec la membrane cellulaire.

Les protéines d'EBOV sont ensuite transcrites de façon séquentielle de l'extrémité 3' du génome vers 5'. La réplication du génome ARN viral nécessite la synthèse d'un ARN antigénomique de polarité positive pour servir de matrice.

La plupart des virions bourgeonnent ensuite de façon horizontale à la surface des cellules. L'expression de VP40 dans des cellules suffit à induire le bourgeonnement des VLP. La présence des GP et de la VP40 permet le relargage des particules avec une morphologie filamenteuse.

Epidémiologie

- *Découverte des Ebolavirus*

Les Ebolavirus ont été décrits pour la première fois à l'occasion de deux épidémies en 1976, l'une au sud du Soudan (284 cas, 51% de mortalité), et la seconde au nord de la République Démocratique du Congo (RDC, ex-Zaïre) (318 cas, 88% de mortalité) [24, 25]. Deux espèces ont été ainsi isolées : le virus Ebola (EBOV) anciennement appelé Zaïre, et le virus Soudan (SUDV). En 1994, une troisième espèce appelée Côte d'Ivoire puis virus Taï Forest (TAFV) a été découverte. Elle a été isolée chez une scientifique qui s'était infectée en travaillant sur un chimpanzé trouvé mort dans la forêt Taï en Côte d'Ivoire. TAFV a d'ailleurs été responsable de la disparition de la moitié de la population de chimpanzés pendant cette période dans cette région de la Côte d'Ivoire [291]. En 2007, une autre espèce d'Ebolavirus pathogène appelée virus Bundibugyo (BDBV), proche de TAFV, a été découverte en Ouganda [29]. Enfin, le virus Reston (RESTV) a été isolée en 1989 à partir d'un singe cynomolgus importé des Philippines et a ensuite réémergé à plusieurs occasions aux Philippines [292], y compris chez le cochon [293]. Aucun cas humain de FH à RESTV n'a été déclaré. De plus, certains éleveurs de cochons aux Philippines ont présenté des anticorps contre ce virus ainsi qu'un

animalier en 1996 aux Etats-Unis [292]. Ces observations suggèrent que RESTV ne serait pas pathogène pour l'homme.

Les espèces EBOV et SUDV réémergent régulièrement en Afrique centrale (Gabon, République du Congo, RDC, Soudan et Ouganda) causant des épidémies avec un taux de mortalité élevé [294]. Ces virus ont aussi été responsables de l'extinction d'une grande partie de la population de chimpanzés et gorilles. De plus, EBOV a été importé en Afrique du Sud du Gabon en 1996 et un second patient a été contaminé par la suite à Johannesburg. Les épidémies de FH Ebola sont listées dans le tableau V.

- *Réservoir du virus et transmission à l'homme*

De nombreuses études ont tenté d'identifier le réservoir animal. Du matériel génétique d'EBOV et des anticorps anti-Ebolavirus ont été retrouvés chez certaines espèces de chauves-souris frugivores mais aucune particule virale n'a encore été isolée chez ces animaux [295]. Le virus Marburg a lui, pu être isolé chez une espèce de chauve-souris, *Rousettus aegyptiacus* [296]. Les mécanismes de contamination de l'homme restent en suspens. Les périodes de chasse des chauves-souris coïncident avec l'occurrence des épidémies [297]. De plus, la consommation de chimpanzés trouvés morts dans la forêt ou chassés a été à l'origine de l'épidémie de Mayibout au Gabon en 1996, et c'est probablement le cas pour d'autres épidémies survenues entre 1994 et 1996 [298]. Ces données suggèrent que l'homme pourrait contracter le virus en consommant de la viande de chauve-souris ou de singe infectés, ou des fruits ou plantes contaminés par des excréta provenant de ces animaux porteurs du virus.

Le virus se propage ensuite par contact direct avec d'autres patients infectés ou avec les cadavres. De l'ARN viral ainsi que des particules virales infectieuses ont ainsi été isolés dans le sperme, les sécrétions génitales, les fluides corporels, les sécrétions nasales et à partir d'échantillons de peaux des patients infectés et de PNH [24, 25, 299]. La transmission du virus est amplifiée avec les rites funéraires et la médecine traditionnelle dans ces régions d'Afrique. Une infection est également possible lors des utilisations multiples de seringues mais les contaminations par aérosols sont à priori rares voire peu probables.

Tableau V. Epidémies de FH à Ebolavirus. D'après [300, 301].

Période	Souche du virus	Région	Nombre de cas	Taux de mortalité	Contamination initiale
1976	EBOV	RDC	318	88%	
juin-nov. 1976	SUDV	Soudan	284	53%	
juin 1977	EBOV	Tandala, RDC	1	mort	
juill-oct. 1979	SUDV	Soudan	34	65%	
nov. 1994	TAFV	Côte d'ivoire	1	survie	Contact au cours d'une autopsie de chimpanzé
déc. 1994-fév. 1995	EBOV	Mekouka, Gabon	49	59%	
1995	EBOV	Kikwit, RDC	317	77%	
février 1996	EBOV	Mayibout, Gabon	35	68%	Contact avec un chimpanzé trouvé mort
juillet 1996	EBOV	Booué, Gabon	60	75%	Chasse ?
oct. 2000-janv. 2001	SUDV	Gulu, Ouganda	425	53%	
nov. 2001-mars 2001	EBOV	Gabon/Congo	123	79%	Contact avec des PNH
déc. 2002-avril 2003	EBOV	Mbomo et Kéllé, Congo	143	90%	Contact avec des PNH
nov-déc. 2003	EBOV	Mbomo, Congo	35	83%	
mai-juin 2004	SUDV	Yambio, Soudan	17	42%	
avril-mai 2005	EBOV	Etoumbi et Mbomo, Congo	12	75%	
août-sept. 2007	EBOV	Kasaï Occidentale, RDC	249	74%	Consommation de fruits et chauves-souris contaminés ?
août-déc. 2007	BDBV	Bundibugyo, Ouganda	56	40%	
déc. 2008-janv. 2009	EBOV	Kasaï Occidentale, RDC	32	47%	
mai 2011	SUDV	Luwero, Ouganda	1	100%	
juill-août 2012	SUDV	Kibaale, Ouganda	24	71%	
sept-oct. 2012	BDBV	Haut-Uélé, RDC	52	48%	

Signes cliniques et pathogénèse

La virulence des Ebolavirus est différente selon les espèces. La pathogénèse d'EBOV uniquement sera abordée ici. Il est à noter que de nombreuses similitudes sont observées dans la pathogénèse induite lors de l'infection par EBOV et SUDV. Lors des épidémies, EBOV est apparu plus virulent avec un taux de mortalité de l'ordre de 60 à 90% alors qu'il n'est que de 40 à 60% lors de l'infection par SUDV. A l'opposé, TAFV et BDBV ont été peu étudiés. Lors des épidémies de BDBV en 2007 et à l'automne 2012, le taux de mortalité estimé était inférieur à 50% [302]. Un seul cas humain confirmé infecté par TAFV est survenu et le malade a survécu. Un deuxième cas probable de FH TAFV est mort. Enfin, comme décrit ci-dessus, RESTV semble ne pas être pathogène pour l'homme.

- *Modèles animaux utilisés*

Des modèles rongeurs (souris et cobayes) ont été utilisés afin d'étudier la maladie causée par EBOV. Les virus isolés chez l'homme ou le PNH n'étant pas pathogènes chez les rongeurs, il est nécessaire de les adapter aux rongeurs pour les rendre létaux. Pour cela, il s'agit d'effectuer des passages en série du virus dans des souris ou cobayes. Les mutations survenant au cours de la réplication peuvent ainsi lui permettre de s'adapter à l'hôte et devenir pathogène. Ces virus adaptés aux rongeurs seront appelés rg-EBOV dans la suite de ce manuscrit. Les modèles rongeurs infectés par rg-EBOV sont utiles afin d'étudier l'efficacité d'antiviraux ou pour tester des candidats vaccins mais ils ne permettent pas d'étudier la pathogénèse de la maladie car ils ne reproduisent pas la pathologie observée chez l'homme.

Les études sur les singes cynomolgus et rhésus ont fournis de nombreuses données sur la pathogénèse de la maladie lors de la FH Ebola comme lors de la fièvre de Lassa.

Les grands singes sont naturellement infectés par les Ebolavirus dans les régions endémiques. Les PNH sont ainsi utilisés comme modèle animal pour étudier l'infection par EBOV. Les PNH sont également sensibles à RESTV et ces observations suggèrent qu'ils seraient plus sensibles au virus. Les PNH reproduisent les signes cliniques et la pathogénèse de la maladie observés chez l'homme [299, 303, 304] et ainsi, il constitue le meilleur modèle animal d'étude de l'infection par EBOV comme dans le cas de la fièvre de Lassa.

- *Signes cliniques*

Les signes cliniques observés lors de l'infection par EBOV sont assez similaires à ceux apparaissant lors de la fièvre de Lassa [51]. La période d'incubation varie de 2 à 21 jours mais est généralement d'environ 5 à 8 jours. Les premiers signes observés sont peu spécifiques : fièvre, malaises, frissons et

céphalées. Les manifestations qui suivent sont d'ordre gastro-intestinal, respiratoire, vasculaire. Des signes hémorragiques surviennent par la suite et sont bien plus marqués que lors de la fièvre de Lassa. Ils comprennent des pétéchies, des conjonctivites, des épistaxis, des gingivorragies, des mélénas, des hématémèses, des ecchymoses et des hémorragies au niveau des muqueuses. Dans les stades tardifs de la maladie, les patients entrent en état de choc grave pouvant amener à des convulsions. Ils présentent des troubles métaboliques sévères et dans la moitié des cas une coagulopathie diffuse. Au niveau cellulaire, une lymphopénie précoce et une thrombocytopénie sont observées et une neutrophilie survient par la suite. Des nécroses sont souvent présentes dans le foie, la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques des patients qui décèdent. Des analyses de sang révèlent une forte concentration de transaminases sériques, une hyperprotéïnémie et une protéinurie. Des nécroses hépatocellulaires sont observées comme lors de la fièvre de Lassa, mais elles ne suffisent pas à expliquer la mort. Les causes de la mort sont inconnues et elle intervient dans un contexte de choc hypovolémique et de défaillance multi-organiques entre 6 et 16 jours après l'apparition des symptômes. Des séquelles telles que des myélites, des pancréatites récurrentes et des uvéites sont parfois observés chez les survivants.

- *Pathogénèse*

⇒ *Cellules cibles*

Le tropisme d'EBOV dépend de l'expression de récepteurs d'entrée du virus par la cellule cible. Plusieurs récepteurs différents des Filovirus ont ainsi été déterminés. La GP d'EBOV se lie par exemple à des lectines de type C comme les molécules DC-SIGN, L-SIGN et hMGL exprimées par les cellules monocytaires DC et macrophages [305, 306]. D'autres molécules ubiquitaires exprimées par des cellules non monocytaires sont également utilisées par EBOV et les Ebolavirus pour entrer dans la cellule cible.

EBOV infecte les mêmes cellules cibles que LASV : les DC et macrophages en premier lieu puis les hépatocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales [299, 303]. Les DC et macrophages permettent une forte réplication et une dissémination du virus à travers le système circulatoire lymphatique et sanguin. Comme pour la fièvre de Lassa, le virus atteint ainsi les ganglions lymphatiques, le foie, la rate, et se propage aux autres tissus. A l'inverse de LASV, EBOV est cytopathique selon les types cellulaires et la réplication virale aboutit à la lyse des cellules infectées. Il est à noter que les DC ne sont pas lysées lors de l'infection par EBOV.

⇒ *Rôle de L'endothélium vasculaire et de La coagulation*

L'endothélium vasculaire joue un rôle prépondérant dans la pathogenèse de la FH à EBOV. Une perte de l'intégrité de l'endothélium vasculaire, associée à des saignements mais sans lésions des cellules endothéliales, est souvent observée chez les malades et chez les singes infectés par EBOV [303]. Le rôle de la GP d'EBOV dans les dommages structurels des cellules endothéliales et les lésions de l'endothélium vasculaire sera abordé ci-dessous. Chez les patients et lors de l'infection expérimentale de PNH par EBOV, des signes de CIVD ont été observés, ce qui n'est pas le cas lors de la fièvre de Lassa. Une augmentation de la dégradation du fibrinogène apparaît lors de l'infection, ce qui explique les dépôts de fibrine disséminés dans les vaisseaux. Ces défauts de coagulation peuvent s'expliquer par de nombreux facteurs comme par la diminution de la protéine C, un anticoagulant naturel dans le sang et par des facteurs sécrétés par les monocytes et macrophages infectés [307]. Un modèle de pathogenèse a également été décrit pour la FH Marburg. Il est basé sur les lésions des cellules endothéliales ainsi que sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire due au relargage de TNF- α par les macrophages infectés [308]. Cependant, lors la FH Ebola, les lésions de l'endothélium vasculaire sont incertaines et les défauts de coagulation intervenants ne peuvent pas seuls expliquer les causes de la mort. Les données actuelles suggèrent que la sécrétion de médiateurs par les CPA, entre autres, participerait au dysfonctionnement du système vasculaire et de coagulation amenant à des atteintes globales multi-organiques, au choc septique et à la mort.

⇒ *Cytotoxicité directe*

Les études *in vitro* ont montré que la GP, par l'intermédiaire de son domaine mucine, induisait l'arrondissement et le détachement des cellules [309]. De plus, des données de cristallographie ont montré que la cytotoxicité directe sur les cellules pouvait être liée à la conformation de la GP, par l'intermédiaire de son domaine transmembranaire replié en épingle à cheveux [310]. Ainsi, il a été proposé que la GP soit responsable de la cytotoxicité sur les cellules endothéliales et ainsi à l'origine de la rupture de l'endothélium vasculaire, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et des signes hémorragiques. Cependant, ces données sont controversées. D'autres données montrent en effet, que la GP n'est pas cytotoxique *in vitro* lorsqu'elle est exprimée en quantité modérée comme c'est le cas lors de la réplication virale [311].

Il a été montré que les cellules infectées par EBOV relarguaient des enzymes protéolytiques endosomales comme les cathepsines [312]. Ces résultats suggèrent que ces molécules pourraient être impliquées dans la cytotoxicité directe du virus sur les cellules cibles et ainsi la destruction de l'endothélium vasculaire.

Réponses immunes lors de la FH Ebola

- *Infection des CPA et conséquences*

Comme abordé précédemment, les CPA sont des cibles précoces de l'infection par EBOV. Ces cellules jouant un rôle fondamental dans la régulation des réponses immunitaires, l'infection par EBOV a des conséquences dramatiques. Il a été montré dans des modèles *in vitro* que l'infection des DC par EBOV n'induit ni l'expression des molécules CD86, CD80 et CD40, impliquées dans l'activation et la costimulation des lymphocytes T, ni la production de cytokines ou chemokines impliquées dans la régulation de l'inflammation et la réponse adaptative comme IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL4, IL-10, IL-2, IL12, IFN- γ [74, 313]. Au contraire, l'infection des monocytes adhérents et macrophages majoritairement par EBOV aboutit à la sécrétion de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 mais pas d'IFN- α [314, 315].

- *La réponse inflammatoire*

Les analyses chez les patients ont permis de caractériser la réponse inflammatoire. Chez les survivants, des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β , IL-6, CCL3 et CCL4 sont sécrétées de façon transitoire très tôt dans l'infection [316]. Le récepteur soluble antagoniste de l'IL-1 (IL-1R antagoniste) ainsi que les récepteurs solubles du TNF- α (TNFR) et de l'IL-6 (IL-6R) sont détectés dans les phases tardives et perdurent pendant la convalescence. Au contraire, les cas fatals sont associés avec des quantités modérées de TNF- α et d'IL-6, et des forts taux d'IL-1R antagoniste et de TNFR solubles ainsi que d'IL-10 juste avant la mort alors que l'expression des cytokines IL-1 β , CCL3 et CCL4 n'est pas modifiée. De plus, des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, CCL3, CCL4 ont également été détectés chez les PNH infectés par EBOV [304].

Il a été montré que des fortes réponses pro-inflammatoires étaient induites suite à l'engagement de la GP d'EBOV avec le TLR-4 et à l'activation du facteur de transcription NF- κ B [317].

- *La réponse IFN de type I*

Plusieurs modèles de souris infectés par rg-EBOV ont permis de mettre en évidence le rôle fondamental de la réponse IFN de type I [318, 319]. En effet, des souris traitées avec des anticorps neutralisants anti-IFN- α/β ne survivent pas à l'infection par rg-EBOV y compris par la souche EBOV sauvage. Des souris transgéniques IFNAR^{-/-} ne possédant pas le récepteur de l'IFN- α/β sont sensibles à l'infection par rg-EBOV ainsi des souris transgéniques STAT1^{-/-} ne possédant le facteur STAT1, impliqué dans la réponse à l'IFN menant à la synthèse des ISG. De plus, le traitement préalable à

l'infection par EBOV avec des IFN recombinants ou des inducteurs d'IFN est apparu efficace chez les souris, mais moins chez les PNH [320].

Dans des expériences chez le PNH, il a été montré que des taux élevés d'IFN de type I étaient détectés dans le sang pendant la phase aiguë de l'infection par EBOV et que les DC et macrophages isolées des PNH infectées puis stimulées étaient capables de sécréter des IFN de type I [304]. Cette observation reste controversée car les analyses chez les patients n'ont pas mis en évidence d'IFN- α dans le sang des malades [321] et les expériences *in vitro* ont montré que les DC infectées ne produisaient pas d'IFN- α [313].

- *La réponse humorale*

Des études cliniques ont été faites lors des épidémies comme celle étant survenu au Gabon en 1996 et les réponses immunes ont ainsi été détaillées chez les patients infectés par EBOV. De fort taux d'anticorps IgG et IgM ont été détectés chez les survivants dès le stade précoce de la maladie. Les IgG détectées sont spécifiques de la NP, de la VP40 et VP35. Aucune réponse IgG spécifique des antigènes viraux n'est apparue chez les cas fatals et de faibles taux d'IgM ont été détectés chez seulement un tiers des patients [321]. De plus, les anticorps neutralisants n'ont pas été détectés.

- *Réponse T*

Il a été montré que l'infection par EBOV n'induisait pas la maturation des DC au regard de l'expression des molécules impliquées dans la présentation de l'antigène et la costimulation des cellules T, empêchant ainsi la stimulation des lymphocytes T et l'induction de la réponse adaptative. De plus, des expériences *in vitro* ont montré que comme lors de l'infection par LASV, les DC infectées par EBOV n'induisaient pas la prolifération des cellules T de réaction lymphocytaire mixte [74, 313].

⇒ *Apoptose des Lymphocytes*

Des analyses chez les patients ont montré qu'une lymphopénie survenait dans les cas fatals lors de l'infection par EBOV et qu'elle était le résultat d'une apoptose massive des lymphocytes T et des cellules NK [321]. Ces types cellulaires n'étant cependant pas infectés par le virus, plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la mort des lymphocytes. Des dysfonctionnements d'activation des DC, la production de médiateurs solubles comme l'oxyde nitrique NO ayant des effets pro-apoptotiques, l'activation des voies des récepteurs de mort induites par leur ligand FasL et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ou encore les interactions avec les protéines virales comme la GP pourraient être impliquées [74, 299, 304, 316, 322].

Le rôle des réponses immunitaires dans la pathogenèse de la FH Ebola est proposé dans la figure 15.

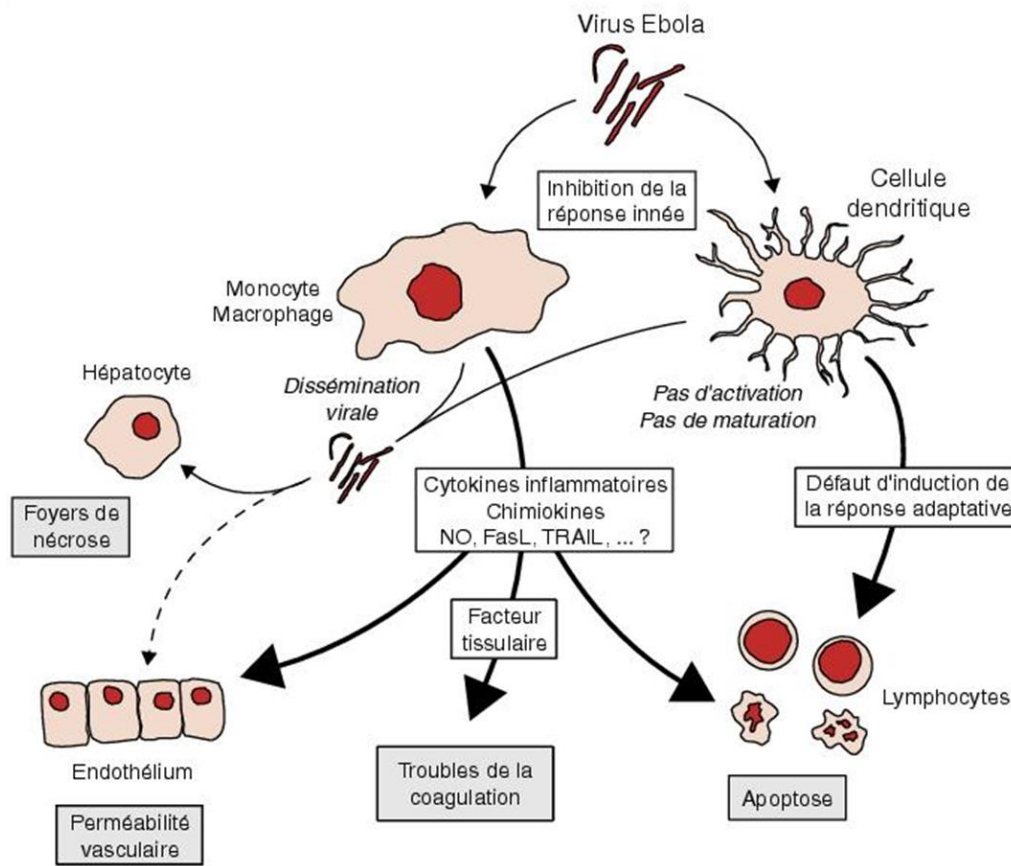


Figure 15. Modèle de pathogenèse de la FH Ebola. Les DC, monocytes et macrophages sont les cibles précoces d'EBOV. Elles disséminent le virus dans les autres cellules cibles et dans tout l'organisme. EBOV inhibe les réponses innées (synthèse d'IFN de type I notamment) et empêche l'activation des DC résultant en une immunité adaptative défectueuse. De plus, lors de l'infection par EBOV, les lymphocytes sont déplétés par apoptose. La forte sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages est probablement responsable de la pathogenèse (augmentation de la perméabilité vasculaire, troubles de la coagulation et induction de l'apoptose des lymphocytes). Tiré de [323].

- **Inhibition des réponses immunes par Les protéines virales**

⇒ *Inhibition de La réponse IFN*

EBOV utilise plusieurs mécanismes afin d'inhiber la production d'IFN de type I ou les voies de réponse à l'IFN. Il a été montré que la VP35 d'EBOV était responsable de l'absence de production d'IFN- α et que les complexes VP35-NP inhibaient la réponse IFN en réprimant le promoteur répondant à l'IFN [324]. La protéine VP35 d'EBOV inhibe la synthèse d'IFN de type I à plusieurs niveaux. Elle se lie aux ARN double brin viraux et empêche leur reconnaissance par l'hélicase RIG-I et donc la synthèse des IFN- α/β [325]. Elle bloque la phosphorylation du facteur IRF-3 et sa translocation nucléaire, en inhibant le complexe IKK- ϵ /TBK1 [326, 327]. Ces mécanismes

d'inhibition de la synthèse d'IFN sont similaires à ceux utilisés par la NP de LASV [233]. La VP35 est également impliquée dans l'inhibition des mécanismes de réponse à l'IFN en bloquant l'activation de la PKR, et donc son activité antivirale d'inhibition de la traduction [328].

La VP24 d'EBOV interfère dans le mécanisme de réponse aux IFN de type I et II en inhibant la synthèse des ISG. Cette protéine empêche l'accumulation du facteur STAT1 phosphorylé, nécessaire à la transcription des ISG. En effet, la VP24 se lie à la karyophérine- $\alpha 1$ qui est le récepteur du signal de localisation nucléaire de STAT1 phosphorylé. Elle empêche ainsi l'interaction de STAT1 phosphorylé avec la karyophérine- $\alpha 1$ et donc sa translocation nucléaire et l'activation de la transcription des ISG [329-331].

⇒ *Inhibition de La réponse adaptative*

La GP joue un rôle dans la pathogénèse par le biais de la régulation de la réponse adaptative. Il a été montré qu'elle était à l'origine de la diminution de la disponibilité des molécules d'adhésion et de présentation des antigènes viraux aux lymphocytes en les masquant [332, 333]. La GP1 et la GP2 possèdent des motifs immunosuppresseurs. Ainsi, le domaine mucine de la GP1 empêche la fixation des anticorps neutralisants anti-EBOV. D'autres études suggèrent que les formes solubles de GP, qui possèdent 295 acides aminés en commun avec la GP de surface, pourraient aussi servir de leurre pour les anticorps neutralisants [290]. Elles sont aussi impliquées dans l'inhibition de l'activation des neutrophiles [334].

Diagnostic et traitements

⇒ *Méthodes de diagnostic*

Le diagnostic de la FH Ebola se fait sur le même principe que celui de la fièvre de Lassa [66]. L'infection est détectée soit par la mesure des anticorps IgG et IgM par ELISA ou immunofluorescence, soit par la détection des antigènes du virus par ELISA et du matériel génétique par RT-PCR. Le diagnostic est aussi possible par microscopie électronique grâce à la morphologie filamenteuse des particules virales mais cette méthode n'est pas utilisée en pratique car elle est longue et coûteuse.

⇒ *Méthodes de traitement*

Certains traitements à l'étude visent à inhiber une étape clé du cycle viral comme l'interaction avec le récepteur cellulaire d'entrée, la fusion membranaire médiée par la GP, la transcription/réplication ou encore les étapes tardives. A l'inverse de la fièvre de Lassa, la ribavirine s'est montrée peu

efficace pour le traitement de la FH Ebola. Des expériences récentes ont montré que l'utilisation d'oligonucléotides antisens ciblant les ARNm viraux administrés de façon précoce après l'infection semblait être une technique prometteuse [335].

Les essais de thérapie par injection de sérum immun anti-EBOV ont donné des résultats controversés dans les hôpitaux ou sur des PNH comme lors de l'infection par LASV. Lors de la FH Ebola, les malades ne développent que de très faibles taux d'anticorps neutralisants suggérant ainsi que l'administration de sérum immun de patients convalescents ne confèrent pas de protection. Des sérums immuns concentrés anti-EBOV produits chez les chevaux semblent être efficace chez les babouins et dans un modèle cobaye infecté par EBOV. Cependant, leur efficacité n'est pas probante chez les singes rhésus ou dans un modèle souris [336]. Lors de l'épidémie en RDC en 1995, des transfusions de sang de patients convalescents contenant des IgG anti-EBOV ont permis d'améliorer la survie d'autres malades en comparaison des patients non traités [337]. Cependant, la réelle implication de ces transfusions dans l'issue de la maladie n'a pu être prouvée et est probablement négligeable. Bien que l'immunogénicité de la GP d'EBOV soit encore discutée, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la GP d'EBOV s'est révélée efficace dans un modèle souris infecté par rg-EBOV [338].

Actuellement, les traitements couramment administrés cherchent plutôt à traiter les symptômes de la maladie. Certains traitements peuvent cibler par exemple les troubles de la coagulation. En effet, les traitements utilisant la protéine anticoagulante dérivée du nématode rNAPc2 ou une protéine C recombinante ont donné des résultats encourageants sur des singes infectés [339].

⇒ *Essais vaccinaux*

De nombreux candidats vaccins ont été testés sur les rongeurs et les PNH [281]. Les premiers essais ont été faits à partir de virus inactivé mais, comme pour la fièvre de Lassa, cette méthode a vite été abandonnée.

Comme pour LASV, plusieurs vecteurs viraux ont été utilisés pour créer des vaccins anti-EBOV : VEEV [278], Adénovirus [340], virus Parainfluenza [341] ou VSV [274]. Le vaccin VSV recombinant atténué exprimant la GP d'EBOV protège les PNH de l'infection par EBOV a même été utilisé pour traiter une scientifique qui s'était infectée [342].

L'apparition des outils de génétique inverse pour les Ebolavirus a permis l'ouverture d'une nouvelle voie dans la conception des vecteurs vaccinaux. Par exemple, il a été montré qu'un EBOV recombinant portant des mutations dans le domaine de la VP35 impliqué dans la suppression de la synthèse d'IFN devient atténué et perd son caractère virulent dans un modèle cobaye [343]. Il

permet également de protéger efficacement des cobayes lors de l'infection par EBOV. Cependant, cette méthode est peu sûre car les EBOV recombinants peuvent muter et pourrait redevenir pathogène lors de l'immunisation. Des VLP exprimant les protéines immunogènes telles que la NP, GP et VP₄₀ d'EBOV ont également été testés [344] mais cette approche reste difficile à mettre en œuvre et coûteuse.

Les cellules Natural Killer, carrefour entre immunité innée et adaptative

Biologie des cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes spécialisés caractérisés chez l'homme par l'expression des molécules CD56 et CD16 et par l'absence d'expression de CD3 et CD19, à l'inverse des lymphocytes T et B respectivement. Les cellules NK constituent entre 2 et 18% des lymphocytes circulant dans le sang [345]. Elles ont tout d'abord été décrites comme des lymphocytes pouvant détruire des cellules tumorales sans aucune stimulation préalable [346]. On sait aujourd'hui qu'elles participent également au contrôle des infections virales, de l'inflammation et qu'elles ont un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative [347, 348].

Les cellules NK ont à l'origine été classées comme des effecteurs de l'immunité innée car leur réponse cytotoxique s'activait très rapidement et n'était pas spécifique de l'antigène rencontré. En effet, à l'inverse des lymphocytes T, les cellules NK ne possèdent, à priori, pas de récepteurs spécifiques de l'antigène. De plus, il n'existe pas de stade naïf des cellules NK et elles sont capables de répondre rapidement après stimulation et n'ont pas besoin de proliférer comme les cellules T. En effet, elles expriment de façon constitutive dans leur cytoplasme des granules de Granzyme (Grz) et Perforine ainsi que des stocks d'ARNm codant l'IFN- γ . Ces molécules sont ainsi disponibles immédiatement après activation [349].

Les cellules NK ont deux fonctions majoritaires : la cytotoxicité naturelle et la production de cytokines. Elles sont capables de lyser les cellules infectées mais également de sécréter des cytokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires ainsi que l'induction des réponses adaptatives par l'orientation de la différenciation des cellules T vers un profil de type Th1 [350].

- *Développement des cellules NK et sous-populations*

Les cellules NK se différencient à partir d'un progéniteur CD34+ commun aux autres lymphocytes T et B. Le développement des cellules NK a lieu en premier lieu dans la moelle osseuse mais des précurseurs de cellule NK qui sont immatures sont également retrouvés dans les tissus périphériques. Il a été proposé que le développement d'une cellule NK mature nécessite plusieurs étapes intermédiaires dans les tissus périphériques notamment dans les organes lymphoïdes secondaires [351]. Un modèle de différenciation des cellules NK dans les organes lymphoïdes

secondaires a été proposé par Freud et Caligiuri. Il comporte quatre stades de différenciation basés sur l'expression des molécules CD34, CD117, CD94 et CD16 : pro-NK, pré-NK, NK immature, NK CD56+. L'acquisition de CD56 marque un stade définitif de la différenciation.

Différentes sous-populations de cellules NK ont été définies selon leurs caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles [352-354]. Chez l'homme, deux sous-populations majeures de cellules NK sont communément définies selon l'expression de CD56 : CD56^{bright} CD16⁻ et CD56^{dim} CD16⁺. Elles présentent des distributions dans les tissus et des fonctions différentes. Dans le sang et la rate, environ 90% des cellules NK sont CD56^{dim} CD16⁺ alors que la plupart des cellules NK dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires sont CD56^{bright}. De plus, il a été décrit que les CD56^{bright} CD16⁻ sont des productrices majeures d'IFN- γ alors que le rôle majoritaire des CD56^{dim} CD16⁺ est la cytotoxicité. Cependant, cette classification est constamment rediscutée avec l'avancée des travaux et les cellules NK adaptent leur réponse en fonction des stimuli environnants. Ainsi, les CD56^{dim} CD16⁺ sont capables de produire de grandes quantités de cytokines mais uniquement rapidement après stimulation (2-4h). A l'opposé, les CD56^{bright} sécrètent les cytokines plus tard (après 16h) et de façon prolongée, permettant ainsi de prolonger l'activation des autres cellules immunes [355]. Les cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ ont une faible capacité proliférative, expriment de fort taux de *killer cell Ig-like receptors* (KIR) et de *natural cytotoxicity receptors* (NCR) et de nombreux granules lytiques. Il a été proposé que la sous-population de cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ constitue une étape intermédiaire de la maturation terminale et que les CD56^{bright} du sang représentent la fraction activée des cellules NK circulantes [351]. Cependant, à l'inverse, il a été montré que les CD56^{dim} CD16⁺ pouvaient dériver des CD56^{bright}.

D'autres sous-populations ayant des fonctions distinctes ont été étudiées. La sous-population CD56^{bright} CD16⁺ est par exemple cytotoxique contre les tumeurs et se différencie à partir des deux autres sous-populations CD56^{dim} CD16⁺ et CD56^{bright} [356]. Une nouvelle sous-population de cellules NK NKp46+ NKp44+ a été récemment étudiée chez l'homme. De façon surprenante, ces cellules ne sont pas cytotoxiques et ne produisent pas d'IFN- γ mais de l'IL-22 [357].

- **Le répertoire NK**

Les cellules NK agissent comme des véritables sentinelles et peuvent discriminer les cellules saines du soi des cellules étrangères ou anormales (non-soi), grâce à l'expression constitutive à la surface des cellules saines de molécules dite spécifiques du soi telles que les molécules du CMH de classe I [349, 358] et à l'expression de récepteurs spécifiques à la surface des cellules NK.

– Transduction du signal d'activation des cellules NK

Au contact de cellules saines exprimant le CMH de classe I, les cellules NK sont inhibées dans leurs fonctions cytotoxiques et cytokiniques et induisent la tolérance : c'est l'hypothèse du « *missing-self* » [359]. En revanche, lors d'un stress (transformation ou infection), les cellules perdent l'expression du CMH de classe I et les cellules NK, ne recevant plus de signal inhibiteur, peuvent les lyser. Cependant, même en l'absence de signal inhibiteur, les cellules NK nécessitent un signal activateur pour répondre. Ceci évite par exemple aux cellules NK de lyser les érythrocytes qui n'expriment pas de molécules de CMH I mais ne fournissent aucun signal activateur [349]. Les cellules NK sont également capables de lyser une cellule exprimant les molécules de classe I lorsque les signaux activateurs sont nombreux et prédominent sur le signal inhibiteur [349]. Lors de la liaison des récepteurs activateurs avec leur ligands et en l'absence de signal inhibiteur, les cellules NK s'activent, prolifèrent, migrent, et acquièrent des capacités cytotoxiques et produisent des cytokines (figure 16). Ainsi, les réponses des cellules NK sont contrôlées par un équilibre entre signaux inhibiteurs et activateurs transmis par différentes familles de récepteurs (figure 16) [349, 360, 361].

Les récepteurs des cellules NK possèdent des motifs ITIM (*immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs*) ou ITAM (*immunoreceptor tyrosine based activation motif*) ou sont associés à des molécules qui en possèdent. Ces motifs transmettent respectivement un signal inhibiteur ou activateur. Lors de la liaison du récepteur avec son ligand, le signal inhibiteur ou activateur est respectivement transmis par la phosphorylation de la tyrosine des motifs ITIM ou ITAM. Certains récepteurs inhibiteurs peuvent cependant bloquer le signal transmis par les récepteurs activateurs en recrutant la phosphatase SHP-1 qui induit la déphosphorylation des substrats proches sur les récepteurs activateurs [362]. Ainsi, l'inhibition efficace des fonctions des cellules NK requiert une proximité entre récepteurs activateurs et inhibiteurs au niveau d'une même zone appelée synapse.

Les récepteurs inhibiteurs possèdent un ou deux domaines intracytoplasmiques ITIM. Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent les molécules du soi comme les molécules du CMH de classe I, exprimées constitutivement sur toutes les cellules saines. Chez l'homme, les récepteurs inhibiteurs appartiennent à deux grandes familles majoritaires : les KIR et les récepteurs hétérodimères CD94/NKG2A. Les récepteurs activateurs des cellules NK, comme ceux des lymphocytes T et B, recrutent des protéines adaptatrices (FcεRIγ, CD3ζ ou DAP12) possédant des domaines ITAM.

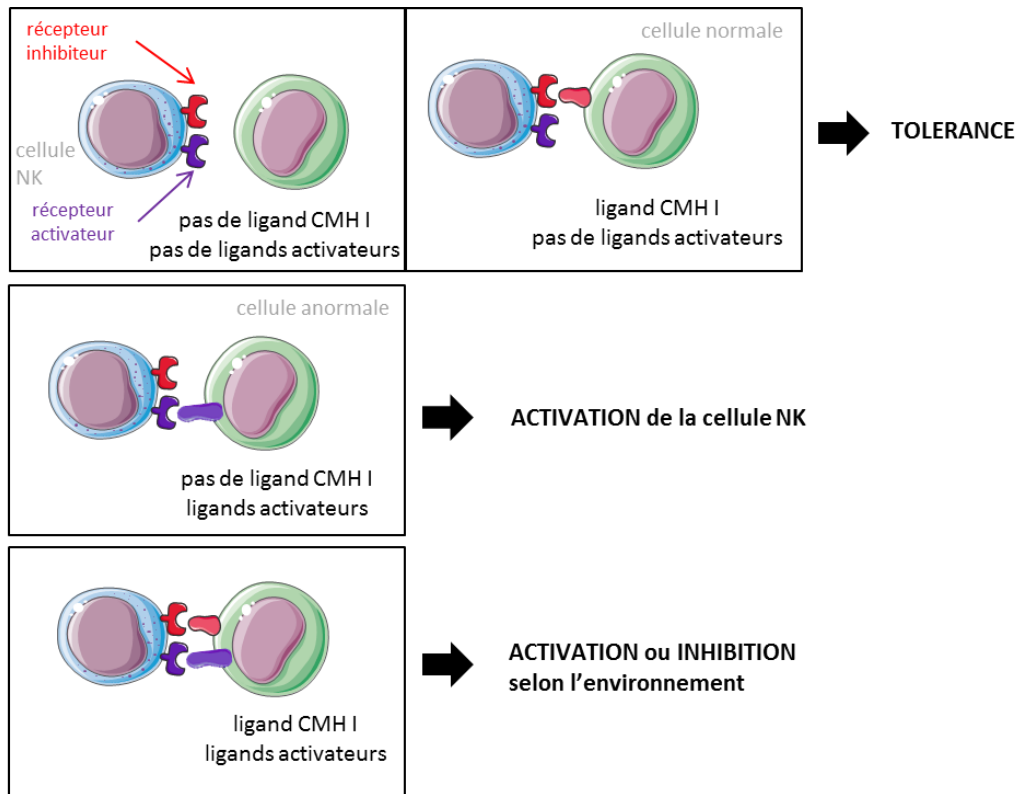


Figure 16. Régulation de l'activation des fonctions des cellules NK par un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Adapté de [349].

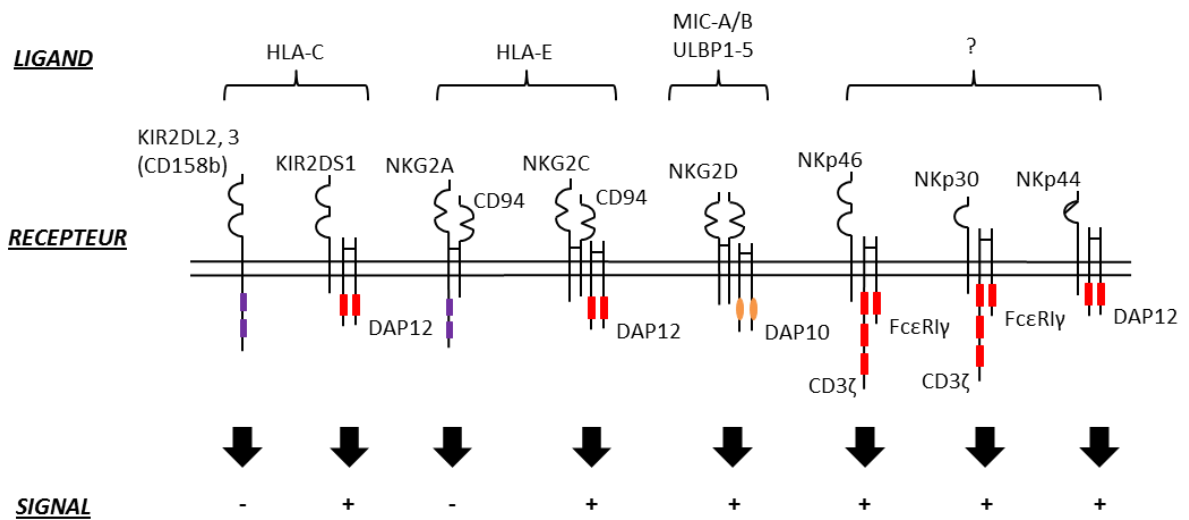


Figure 17. Organisation structurale de certains récepteurs et des protéines adaptatrices associées à la surface des cellules NK. Les motifs ITIM (rectangle violet), ITAM (rectangle rouge) et le domaine de liaison à la PI_3K (cercle orange) permettant de transmettre les signaux inhibiteurs (-) ou activateurs (+) sont représentés. Adapté de [363].

– Récepteurs reconnaissant le CMH-I

Les récepteurs reconnaissant les molécules classiques et non classiques du CMH-I appartiennent à deux grandes familles chez l'homme : les KIR et les récepteurs hétérodimères CD94/NKG2. Ils peuvent transmettre des signaux activateurs et inhibiteurs.

⇒ *La famille des KIR*

Chez l'homme, les KIR (regroupés sous l'appellation CD158) sont codés par 15 gènes et 2 pseudo-gènes sur le chromosome 19 [364]. Chaque cellule NK exprime entre deux et six KIR. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I possédant deux (KIR2D) ou trois (KIR3D) domaines Ig dans la région extracellulaire et un domaine cytoplasmique long (L) avec un ou deux motif ITIM ou court (S) sans motif ITIM (figure 17). Il existe des inhibiteurs qui possèdent généralement deux domaines Ig et une longue queue cytoplasmique (KIR2DL) et des KIR activateurs qui ont un domaine cytoplasmique court permettant de recruter les protéines adaptatrices possédant des motifs ITAM. Les protéines adaptatrices comme DAP12 permettent d'initier la cascade d'activation par la phosphorylation du motif ITAM par les kinases Src ou syk/ZAP70. A l'intérieur de la famille KIR, les récepteurs activateurs et inhibiteurs sont généralement codés par des gènes différents et non par l'épissage alternatif d'un seul gène. Cependant, certains allèles du gène KIR3D codent des récepteurs inhibiteurs ou activateurs.

Les récepteurs de la famille des KIR reconnaissent les molécules du CMH de classe I HLA-A, B et C. Par exemple, CD158b (KIR2DL2/L3) lie les protéines HLA-C. La reconnaissance par les KIR nécessite un trimère de HLA composé d'une chaîne lourde, d'une microglobuline β_2 associé à un peptide.

⇒ *CD94/NKG2*

Les familles de gènes CD94 et NKG2A sont localisées sur le chromosome 12 chez l'homme [349]. Elles codent des récepteurs qui reconnaissent les molécules du CMH-I non conventionnel, HLA-E. Un seul gène CD94 est lié à quatre familles de gènes NKG2. Ces gènes codent des protéines transmembranaires de type II de la famille des lectines de type C. CD94 est exprimé en homodimère à la surface cellulaire ou bien est associé avec NKG2A ou NKG2C (figure 16). NKG2A possède un domaine ITIM et l'hétérodimère CD94/NKG2A transmet un signal inhibiteur alors que l'hétérodimère CD94/NKG2C est un récepteur activateur associé à la protéine adaptatrice DAP12. Bien qu'ayant des fonctions opposées, les hétérodimères CD94/NKG2A et CD94/NKG2C reconnaissent HLA-E mais la liaison de CD94/NKG2A avec HLA-E est de plus forte affinité et prédomine.

⇒ *Autres récepteurs reconnaissant Le CMH I*

Il existe d'autres récepteurs reconnaissant des molécules du CMH de classe I [349]. LILRB1 est par exemple un récepteur inhibiteur exprimé par les cellules NK qui se lie avec une faible affinité à une région conservée présente sur toutes les protéines HLA. LILRB1 est codé par un des 13 gènes de la famille LILR (appelée également LIR, ILT et CD85) sur le chromosome 19. Son rôle est mineur par rapport aux récepteurs KIR et CD94/NKG2.

– Récepteurs activateurs

Lorsqu'une cellule devient anormale, elle exprime des molécules du non-soi qui sont reconnues par des récepteurs activateurs. Il existe deux grands types de récepteurs activateurs : les récepteurs de la famille des NCR et le récepteur NKG2D. Les NCR et NKG2D sont complémentaires et coopèrent également car les cellules cibles peuvent exprimer de multiples ligands [365].

⇒ *Les récepteurs de la famille des NCR*

Les récepteurs de la famille des NCR ont été identifiés par le criblage d'anticorps monoclonaux capable d'induire la lyse de cellules tumorales [360, 366]. La liaison d'un anticorps monoclonal avec le NCR induit la cytotoxicité, la mobilisation du Ca^{2+} mais également la production de cytokines. Cette nouvelle famille de récepteurs permettant d'induire la cytotoxicité a été appelée NCR. Lors de ces tests, les anticorps monoclonaux réagissaient avec des protéines de 46, 30 et 44 kDa appelées respectivement NKp46 [367], NKp30 [368] et NKp44 [369, 370].

Il existe une corrélation entre le niveau d'expression des NCR et le potentiel cytolytique des cellules NK [367, 368]. La diminution de l'expression des NCR résulte en une réduction de la cytotoxicité médiée par les cellules NK contre la majorité des cellules tumorales. NKp46 et NKp30 sont exprimés par toutes les cellules NK alors que NKp44 est uniquement présent sur les cellules NK activées. NKp46 est codé par un gène du chromosome 19 et les gènes codant les récepteurs NKp30 et NKp44 sont situés sur le chromosome 6. Les NCR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à la superfamille des Ig. La région cytoplasmique ne possède pas de motif ITIM ou ITAM mais un résidu chargé, situé dans le segment transmembranaire, permettant l'interaction avec une protéine adaptatrice possédant un motif ITAM. NKp46 et NKp30 recrute les protéines adaptatrices CD3 ζ /Fc ϵ R1 γ alors que NKp44 s'associe avec DAP12 (figure 17).

Les ligands des NCR sont encore mal connus. Des études ont montré que NKp46 et NKp44 pouvaient reconnaître des hémagglutinines de certains virus. Par exemple, NKp30 peut se lier à la protéine pp65 du cytomégalovirus humain [371].

⇒ *NKG2D*

NKG2D est un récepteur activateur codé par un gène situé sur le chromosome 12 mais qui a très peu d'homologie avec les autres NKG2. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II de la famille des lectines de type C qui fonctionne en homodimère et est associé à la protéine adaptatrice DAP10 (figure 17).

Lors de la liaison de NKG2D avec son ligand, DAP10 est phosphorylé ce qui permet le recrutement de la PI3K et l'activation de différentes voies de signalisation [372]. L'expression du récepteur NKG2D est régulée par l'environnement cytokinique. Par exemple, son expression est augmentée en présence d'IL-15 ou de TNF- α et elle est diminuée en présence de TGF- β . En revanche, les mécanismes de régulation des gènes codant les ligands de NKG2D sont peu connus.

Le récepteur NKG2D reconnaît des glycoprotéines cellulaires de surface ayant une structure proches des molécules du CMH de classe I mais qui ne sont ni des structures de présentation de l'antigène, ni ne sont codées par les gènes du CMH de classe I : ce sont les protéines Mic-A et Mic-B, codés par les gènes du CMH, et les ULBP (*UL-16 binding proteins*) 1, 2, 3 et 4 [373].

⇒ *Autres récepteurs et corécepteurs d'activation*

D'autres travaux ont montré l'existence d'autres récepteurs pouvant transmettre un signal activateur. C'est le cas des molécules 2B4, NTB-A, NKp80, DNAM-1, CD96, CD59 et CD160 [374-377]. Leur rôle est controversé mais il semblerait qu'ils agissent comme des corécepteurs en permettant d'amplifier le signal donné par les ITAM des récepteurs activateurs principaux NCR et NKG2D. De la même façon, le rôle des récepteurs activateurs spécifiques des molécules du CMH de classe I (KIR2DS et CD94/NKG2C) est encore discuté. Ils pourraient agir « en dernier recours » sur des cellules NK exprimant peu de NCR ou lorsque la cellule cible n'exprime pas de ligand de NKG2D.

CD16 constitue également un récepteur activateur. Il reconnaît avec une faible affinité le fragment Fc des anticorps. Grâce à l'expression de CD16, les cellules NK sont en mesure de reconnaître puis de lyser les cellules couvertes d'anticorps par le mécanisme de cytotoxicité dépendante d'anticorps.

Les cellules NK possèdent également des récepteurs leur permettant d'adhérer à d'autres cellules. Elles peuvent par exemple se lier à VCAM-1 exprimé sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4). Grâce à ces molécules d'adhésion, les cellules NK peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse des lésions de l'endothélium vasculaire [378]. DNAM-1 permet aussi la liaison avec les molécules Nectin-2 et PVR. L'interaction DNAM-1/PVR pourrait d'ailleurs jouer un rôle dans la migration des cellules NK aux endothélium vasculaires, comme c'est le cas pour les monocytes.

La molécule CD96, homologue à 20% de DNAM-1, se lie aussi à PVR et semble jouer un rôle dans l'adhésion et l'activation des cellules NK.

– Récepteurs de cytokines et chemokines

Les cellules NK expriment des récepteurs de cytokines tels que IFNAR, CD25 (IL-2R α) et les récepteurs des cytokines IL-1, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 ainsi que les récepteurs de chemokines CCR2, CCR5, CCR7, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR6, CX3CR1, Chem23R et S1P1 [348]. L'expression de ces récepteurs varie en fonction des sous-populations de cellules NK et de leur statut d'activation. Les cellules NK sont ainsi capables de répondre à toute une variété de cytokines et chemokines. Les cytokines entraînent l'activation ou la modulation des réponses des cellules NK et les gradients de molécules chimiotactiques régulent leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires ou vers les sites de l'inflammation [345, 379, 380].

De nombreuses chemokines telles que CCL3, CXCL9, CXCL10 ou S1P régulent la migration des cellules NK [381]. S1P est par exemple exprimé en grandes quantités dans le sang et la lymphe et peu dans les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi, les cellules NK qui expriment S1P1 auront tendance à quitter les organes lymphoïdes secondaires selon le gradient de S1P pour rejoindre la circulation. De même, l'expression de CCR7 est restreinte aux cellules NK des organes lymphoïdes secondaires [382]. Les cellules NK de la sous-population CD56^{bright} CD16⁻ expriment CCR7 et sont ainsi retrouvées majoritairement dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules NK exprimant CXCR3 peuvent répondre aux chemokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 et peuvent donc rejoindre les tissus enflammés [383, 384].

• *Les fonctions effectrices des cellules NK*

L'activation des cellules NK induit la prolifération, la migration mais surtout l'augmentation de la cytotoxicité et la production de cytokines.

– Les fonctions cytotoxiques

Les cellules NK activées lysent les cellules cibles par deux mécanismes différents : la voie des récepteurs de mort et la voie Perforine/Grz, lesquelles sont décrits dans la figure 18.

Les cellules NK expriment les ligands TNF- α , FasL et TRAIL des récepteurs de mort TNFR, Fas (CD95) et TRAIL-R (DR4 et DR5) respectivement présents à la surface des cellules cibles. L'engagement de ces récepteurs induit l'apoptose par activation des caspases.

Les cellules NK possèdent également des vésicules cytotolytiques contenant des molécules de Perforine et des protéases appelées Grz. Lors de l'activation des cellules NK, les vésicules d'exocytose sont relarguées à proximité de la cellule cible. Les molécules de Perforine forment alors des pores dans la membrane de la cellule cible par lesquels les Grz entrent. GrzB est le constituant majeur des vésicules cytotolytiques. Il induit la mort cellulaire par la voie des caspases mais aussi par une voie indépendante des caspases par le biais du clivage de la protéine Bid et le relargage de cytochrome c par la mitochondrie [385]. Il a été montré que GrzB avait également un rôle antiviral direct par le clivage de protéines virales impliquées dans la réplication virale ou la pathogénicité.

La fonction cytotoxique des cellules NK est primordiale pour la lyse des cellules tumorales et des cellules infectées par un pathogène. Cette fonction permet également la régulation des réponses immunitaires. Les cellules NK peuvent lyser les lymphocytes T autoréactifs [386], les DC immatures et les macrophages hyperstimulés.

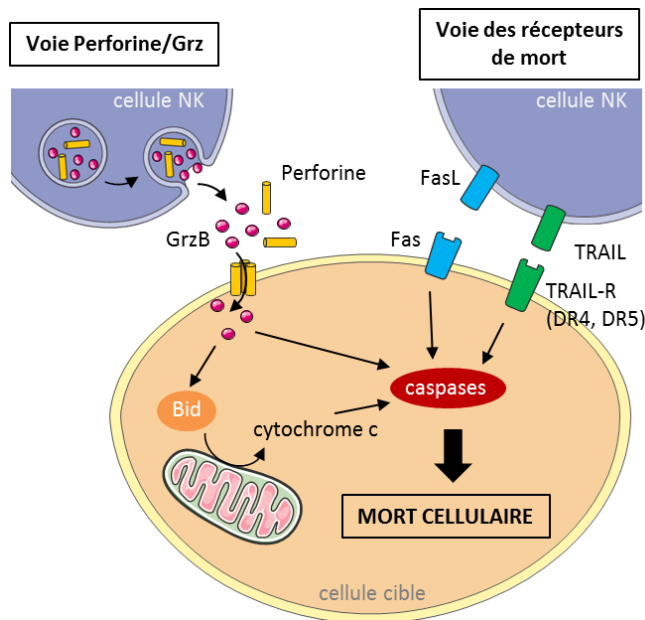


Figure 18. Voies d'induction de la mort cellulaire par les cellules NK. La voie des récepteurs de mort passe par l'engagement FasL/Fas ou TRAIL/TRAIL-R.

– La production de cytokines

Les cellules NK produisent toutes une variété de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α , le TNF- β , l'IL-10, le GM-CSF et de chemokines comme le CCL₂, le CCL₃, le CCL₄, le CCL₅ et l'IL-8. La production de ces facteurs permet de réguler les réponses immunes, la migration et la survie des cellules. L'IFN- γ produit par les cellules NK dans les ganglions lymphatiques joue par exemple un rôle important

dans la différenciation des lymphocytes T et entraînant une orientation Th₁ à la réponse adaptative [387].

Régulation des réponses des cellules NK

La majorité des cellules NK du sang circulant sont très peu cytotoxiques et elles requièrent un signal d'activation. La modulation du répertoire des récepteurs des cellules NK est régulée par de nombreux facteurs et notamment par l'intermédiaire de l'environnement cytokinique [388]. Les cellules NK peuvent s'activer suite à la reconnaissance des PAMP par les PRR mais la potentialisation de leurs fonctions effectrices requiert à la fois un contact cellulaire avec des cellules accessoires et des facteurs solubles sécrétés par ces cellules.

Les cellules NK expriment les TLR₃, TLR₇ et TLR₈ permettant de détecter des PAMP viraux. L'engagement de ces récepteurs avec un PAMP permet l'activation, la prolifération, la production de cytokines et la cytotoxicité des cellules NK. Par exemple, il a été montré que des ARN viraux pouvaient activer les fonctions des cellules NK [389-391].

Les interactions entre les cellules NK et les DC ont été largement étudiées tandis que peu de travaux se sont attachés à analyser le dialogue avec les macrophages. Ces travaux ont montré que les interactions permettaient d'amplifier les réponses immunitaires. Les interactions entre les cellules NK et les DC conduisent d'une part à l'activation des cellules, et d'autre part à la maturation ou à la lyse des DC [392]. *In vivo*, les cellules NK peuvent rencontrer les CPA au niveau de la zone T dans les ganglions lymphatiques ainsi que dans les tissus périphériques enflammés car elles expriment des récepteurs de chemokines et sont capables de migrer en réponse aux signaux chimiotactiques [387, 393]. Les conséquences des interactions entre les CPA et les cellules NK sont représentées sur la figure 19.

- **Activation des cellules NK**

Les DC permettent d'augmenter l'activation, la prolifération et les réponses effectrices des cellules NK telles que la production de cytokines et la cytotoxicité. Ce mécanisme requiert à la fois des facteurs solubles sécrétés par les DC et le contact cellulaire entre les deux populations.

Les cytokines IL-12, IL-15, IL-18 et les IFN de type I sont impliqués dans l'activation des cellules NK. L'IL-12 est primordiale pour la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK [394, 395]. L'IL-18 coopère également avec l'IL-12 pour induire la cytotoxicité et la production de cytokines [396]. L'IL-15 augmente la prolifération et la survie des cellules NK [393, 397]. *In vivo*, l'IL-15 se trouve

principalement lié au récepteur IL-15R α à la surface des cellules accessoires et ainsi, la stimulation des cellules NK par l'IL-15 présenté par les DC requiert l'expression de ce récepteur à la surface des deux populations cellulaires [398]. Les IFN de type I jouent également un rôle important dans l'activation des cellules NK. L'IFN- α augmente par exemple la capacité cytotoxique des cellules NK contre des pDC immatures [399, 400]

Le contact cellulaire avec les DC est primordial pour induire l'activation des cellules NK [394, 401]. Il permet notamment l'engagement des récepteurs activateurs à la surface des cellules NK par les ligands exprimés par les DC. Le récepteur NKp30 est notamment impliqué dans l'activation des cellules NK par les DC [402]. De plus, il a été montré que la stimulation des cellules NK par les cytokines sécrétées par les DC nécessite un contact étroit entre les cellules. En effet, les interactions entre les cellules NK et les DC conduisent au réarrangement du cytosquelette, à la mobilisation des radeaux lipidiques et ainsi à la formation d'une synapse permettant le passage de l'IL-12 sécrétée par les DC directement dans le cytoplasme des cellules NK [395]. D'autres études ont également démontré que l'IL-18 sécrété par les DC était délivrée aux cellules NK d'une façon similaire [403].

Comme les DC, il a été montré que les macrophages induisaient la prolifération des cellules NK, l'expression de certains récepteurs activateurs à leur surface, la sécrétion d'IFN- γ et l'augmentation du potentiel cytotoxique entraînant la lyse de cellules cibles [404]. Ce mécanisme implique les récepteurs 2B4 et CD48 à la surface des macrophages.

- *Activation des DC*

Les cellules NK sont capables de stimuler les DC conduisant alors à la sécrétion de cytokines par les DC. Le contact cellulaire entre les cellules NK et les DC ainsi que les cytokines sécrétées par les cellules NK jouent un rôle fondamental dans la maturation des DC. Des travaux ont montré que les cellules NK activent les DC par l'intermédiaire de NKp30 et des cytokines l'IFN- γ et le TNF- α [405]. La costimulation des DC par les cellules NK est essentielle pour le développement de la réponse T [350]. En effet, la présence des cellules NK induit le développement de DC sécrétant de l'IL-12 et permettant l'orientation Th1 des lymphocytes T CD4+ (sécrétant de grandes quantités d'IL-2). Les cellules NK permettent différentes orientations de la réponse T selon les cytokines présentes dans l'environnement. La réponse T de type Th1 est favorisée en présence de cellules NK stimulées par l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-18 alors qu'en présence d'IL-4, les cellules NK induisent le développement de cellules T ne sécrétant que de faibles taux d'IL-2 [406]. Les cellules NK favorisent également la réponse des lymphocytes T CD8+ en induisant l'expression d'IL-15 transmembranaire sur les DC [407].

- Lyse des DC

Des travaux ont montré que les interactions entre les cellules NK et les DC à un ratio NK/DC proche de 5/1 conduisait à la lyse des DC immatures par les cellules NK [408]. L'engagement du récepteur NKp30 est crucial dans ce mécanisme [402]. En revanche, l'augmentation des molécules du CMH I entraîne la résistance des DC immatures à la lyse médiée par les cellules NK. D'autres travaux ont montré que CD40 pouvait également être impliqué dans la lyse des DC [409]. La lyse des DC par les cellules NK permet l'homéostasie des DC mais aussi la régulation des réponses immunitaires.

Il a été également montré que les cellules NK étaient capables de lyser les macrophages stimulés par de fortes concentrations de LPS [404]. Ce mécanisme nécessite l'engagement de NKG2D avec ses ligands exprimés à la surface des macrophages. Ces observations suggèrent que les cellules NK pourraient être capables d'éliminer les macrophages hyperstimulés *in vivo* et ainsi de réguler les réponses immunitaires et de contrôler les mécanismes d'immunopathogénèse.

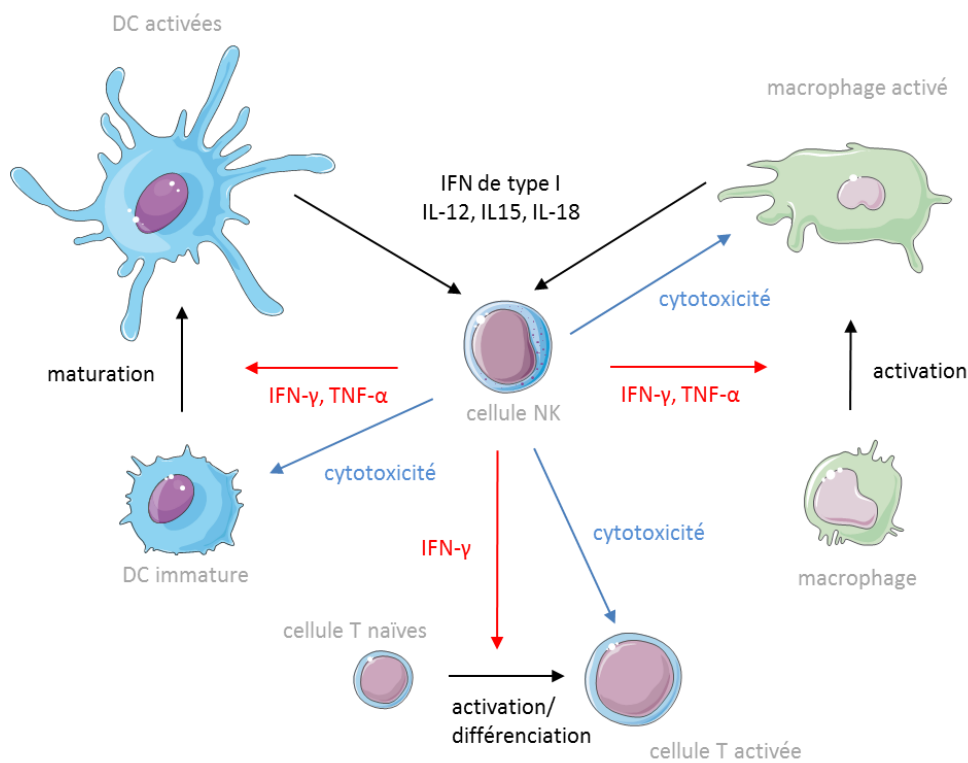


Figure 19. Régulation des réponses immunes par les interactions entre les cellules NK et les CPA (DC ou macrophages). Adapté de [347].

Rôle des NK dans les infections virales

Très tôt, des observations ont montré que les cellules NK étaient impliquées dans le contrôle des infections par les Herpesvirus chez l'homme. En effet, les patients qui ne possèdent pas de cellules NK sont plus sensibles au cytomégalovirus humain [410].

Par la suite, l'importance des cellules NK dans le contrôle de la réplication virale a été montré dans les infections par le virus de l'herpès simplex, HIV, le virus Sendaï, le virus de l'hépatite C, le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune [381, 411].

- *Conséquences de l'infection virale sur les cellules NK*

Certains virus tels que les Herpesvirus (cytomégalovirus humain et murin, virus Epstein-Barr, virus de la varicelle-zona), le virus de l'hépatite C, HIV et EBOV affectent le nombre de cellules NK [412]. Les cellules NK sont par exemple déplétées dans un modèle souris mais également chez les PNH infectés par EBOV [413, 414]. Une lymphopénie transitoire impliquant les cellules NK a été également observée dans le sang chez les PNH infectés par LASV [100] mais il est plus probable qu'elle soit associée à la relocalisation de ces cellules plutôt qu'à la mort cellulaire.

L'activation des cellules NK est régulée par un équilibre entre des signaux inhibiteurs et activateurs et requiert l'engagement des récepteurs activateurs et l'absence de signal transmis par les récepteurs inhibiteurs. Lors des infections virales, l'expression des récepteurs ou de leurs ligands peut être modulée conduisant ainsi à des fonctions défectueuses des cellules NK. Certains virus affectent ainsi l'activation et les fonctions effectrices des cellules NK [411].

Bien que les cellules NK produisent de l'IFN- γ et soient cytotoxiques chez les patients lors de la phase aigüe de l'infection par le virus de l'hépatite C humaine [415], des travaux ont montré que la protéine de l'enveloppe virale E2 était capable d'inhiber les fonctions des cellules NK [416]. L'expression de NKG2D est augmentée à la surface des cellules NK dans de l'infection par le virus de l'hépatite B humaine chez les patients [415].

Lors de l'infection par le virus de la dengue, l'activation des cellules NK est corrélée avec une infection peu sévère [417]. En effet, les cellules NK s'activent rapidement comme en témoigne l'augmentation de l'expression des molécules CD69 et HLA-DR et prolifèrent chez les patients infectés tandis qu'une réduction du nombre de cellules NK est associée à des symptômes hémorragiques.

Le répertoire des récepteurs est modulé à la surface des cellules NK lors de l'infection par HIV-1. En effet, il a été montré chez les patients et dans des modèles *in vitro* que l'expression des récepteurs NKp30, NKp44, NKp46, et CD85j était diminuée à la surface des cellules NK lors de l'infection par HIV-1 affectant ainsi la lyse des cellules infectées par cellules NK [418, 419, 420]. La lyse des cellules T CD4+ par les cellules NK est régulée par l'expression d'un ligand de NKp44 [421].

Le cytomégalo virus humain inhibe l'expression d'un isoforme de Mic-A, un ligand de NKG2D, à la surface des fibroblastes infectés, entraînant ainsi l'absence de lyse de ces cellules par les cellules NK. Une forme tronquée de Mic reste cependant exprimée à la surface des cellules infectées, les rendant ainsi susceptible à la lyse par les cellules NK.

Des travaux ont montré que les cellules NK activées sont capables de lyser les DC infectées par les Filovirus EBOV et Marburg par l'engagement de NKp30 [422]. Les cellules NK lyse les DC infectées par EBOV par un mécanisme dépendant de la molécule lytique Perforine [423]. Cette molécule est également impliquée dans la lyse des cellules infectées par le cytomégalo virus murin alors que TRAIL permet la lyse des cellules infectées par le virus de l'encéphalomyocardite [411].

- *Coopération avec Les DC et macrophages*

Les interactions entre les cellules NK et les cellules accessoires telles que les DC et macrophages sont primordiales pour l'activation optimale des cellules NK conduisant à la production de cytokines et à l'induction de la cytotoxicité. Elles entraînent également l'activation des DC et macrophages et le développement des réponses immunes adaptatives. Le dialogue réciproque entre les cellules NK et les DC et macrophages est essentiel lors des infections par les pathogènes.

La coopération entre les cellules NK et les DC et macrophages a été bien étudiée lors de l'infection par le *Plasmodium falciparum* [424, 425]. Les cellules NK s'activent suite à la reconnaissance des érythrocytes infectés par les PRR. Cependant, la présence de DC matures ou macrophages notamment est requis pour l'induction de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK et ce, par l'intermédiaire d'IL-18 sécrété par les macrophages lors de l'infection. En retour, les cellules NK sont nécessaires pour maintenir le statut activé des DC et monocytes en réponse aux érythrocytes infectés par le *Plasmodium falciparum*. Lors de l'infection par le parasite *Leishmania amazonensis*, les cellules NK activent les DC infectées, lesquelles, en retour, induisent l'activation des cellules NK [426]. De plus, lors du transfert adoptif de ces cellules NK ainsi activées chez des souris infectées, elles sont capables d'activer les DC et les réponses T et de participer au contrôle de l'infection.

Des travaux ont montré que, dans un modèle *in vitro* de coculture de macrophages et de PBMC, que les macrophages infectés par *Salmonella* induisent l'activation des cellules NK, la production d'IFN- γ

et le contrôle de la multiplication de ces bactéries dans le cytoplasme des macrophages [427]. La sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK requiert la présence de cellules accessoires sécrétant de l'IL-2 et/ou l'IL-15 et de l'IL-12/IL-18 produit par les macrophages infectés. L'activation des cellules NK dépend également du contact cellulaire avec les macrophages et notamment de l'expression du récepteur de l'IL-12 à la surface des cellules NK au niveau d'une zone de contact.

Les NK reconnaissent les DC infectées par le virus de la grippe par le biais des récepteurs NKp46 et NKG2D [428]. Les interactions avec les DC infectées permettent l'activation des cellules NK et la sécrétion d'IFN- γ . Les cellules NK sont également activées et produisent de l'IFN- γ lors du contact cellulaire avec des macrophages infectés par le virus de la grippe A ou le virus Sendaï [429]. Les macrophages infectés induisent l'expression des récepteurs de l'IL-12 et de l'IL-18 par l'intermédiaire de l'IFN- α . Lors de l'infection par HIV-1, il a été montré que les cellules NK de la sous-population CD85j+ sont capables de contrôler la réplication virale dans les DC et ce, par le biais d'un contact direct entre les cellules NK et les DC impliquant CD85j [420].

- **Rôle immunopathologique des cellules NK**

L'élimination des cellules immunitaires infectées par les cellules NK peut également contribuer à l'induction de réponses immunes défectueuses et à la pathogenèse. Lors de l'infection par HIV-1, les cellules NK participent à la diminution du nombre de cellules T CD4+ et à l'augmentation de la charge virale chez les patients infectés, et ce grâce à l'induction d'un ligand de NKp44 [421]. En effet, lors de l'infection, les cellules T CD4+ non infectées expriment ce ligand induit par la protéine de l'enveloppe gp41 de HIV-1 et sont sensibles à la lyse médiée par les cellules NK tandis que HIV-1 induit l'internalisation de ce ligand dans les cellules T CD4+ infectées par l'expression de la protéine virale Nef, empêchant ainsi la lyse par les cellules NK [430]. Par ailleurs, il a été montré dans un modèle *in vitro* que les cellules NK pouvaient augmenter la réplication virale dans des DC par l'intermédiaire du facteur HMGB1 [431].

- **Un exemple : rôle des cellules NK lors de l'infection par LCMV**

Il n'y a aucune étude concernant les réponses des cellules NK au cours de l'infection par LASV. En revanche, les réponses des cellules NK ont été largement étudiées dans des modèles souris ou macaques infectés différentes souches de LCMV [381, 432]. LASV et LCMV sont des Arénavirus de l'ancien monde et ils partagent des caractéristiques communes, dont la capacité de la NP à inhiber les réponses IFN- α/β [230]. Ainsi, l'étude des infections par LCMV peut fournir des outils intéressants pour comprendre les réponses des cellules NK impliquées dans les réponses immunitaires déclenchées lors de l'infection par LASV.

Les cellules NK sont déplétées rapidement chez les macaques rhésus infectés par la souche virulente WE et LCMV et également lors de l'infection par la souche non virulente Armstrong [433]. Le taux de cellules NK circulantes retourne à la normale dans les deux semaines chez les survivants mais la lymphopénie est maintenue chez les cas fatals.

Lors de l'infection de souris par LCMV, de forts taux d'IFN de type I sont détectés mais pas d'IL-12, ni d'IFN- γ [240, 432, 434]. Les cellules NK sont apparues cytotoxiques très tôt après l'infection mais elles étaient incapables de sécréter de l'IFN- γ [435, 436]. Les fortes quantités d'IFN de type I sont à l'origine de l'absence de production d'IL-12, ce qui contribue ensuite à l'absence de sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK [437]. Les cellules NK ne jouent ainsi qu'un rôle mineur dans l'infection par LCMV chez la souris de par l'absence de sécrétion d'IFN- γ pouvant contribuer à l'initiation des réponses adaptatives.

Problématique

Les FH Lassa et Ebola constituent des problèmes importants de santé publique en Afrique. Les mécanismes concernant le développement des réponses immunes et de la pathogenèse associées à l'infection par LASV et EBOV sont peu connus. Ces virus sont des agents extrêmement pathogènes et ils doivent être manipulés en laboratoire P4. Le PNH constitue le modèle animal le plus pertinent mais son utilisation dans de telles conditions est compliquée, onéreuse et pose des problèmes éthiques. Notre laboratoire s'attache à développer des modèles *in vitro* afin de permettre d'étudier les réponses immunitaires induites lors de l'infection par ces virus chez l'homme.

Les DC et les macrophages sont les premières cellules cibles lors de l'infection par LASV et EBOV. Elles permettent la réplication des virus et la dissémination dans tout l'organisme. Ces CPA sont également cruciales pour l'induction des réponses immunitaires innées et adaptatives. Par ailleurs, les cellules NK sont également des cellules clés de la réponse immune. Une fois activée, elles sont capables d'une part, de sécréter des cytokines importantes dans la régulation de la réponse des lymphocytes T, et d'autre part, de participer à l'élimination du virus en lysant les cellules infectées. L'activation des cellules NK est impliquée dans le contrôle des infections virales. Bien que cette observation soit constamment rediscutée lors de l'infection *in vivo* chez l'homme, le rôle des cellules NK ne doit pas être sous-estimé car ces cellules sont capables de contribuer à l'amélioration des réponses immunes à plusieurs niveaux. L'efficacité du système immunitaire réside ainsi dans la redondance des réponses mises en jeu. Les interactions entre les cellules NK et les CPA entraînent la mise en place d'un dialogue réciproque. Elles conduisent à l'activation des fonctions effectrices des cellules NK. En retour, les cellules NK peuvent activer les CPA et ainsi participer à l'initiation des réponses immunitaires adaptatives.

Lors de l'infection par LASV et EBOV, le rôle des cellules NK et les conséquences de leurs interactions avec les DC et macrophages sur la mise en place des réponses immunes et la pathogenèse sont très peu connus. Des travaux ont par exemple montré que les cellules NK sont importantes dans le contrôle de l'infection par EBOV et qu'elles pourraient notamment être impliquées dans le contrôle de l'infection chez les survivants lors des épidémies. Dans le cadre de cette thèse, nous avons alors développé un modèle *in vitro* de coculture de cellules NK humaines avec des CPA infectées afin d'étudier le rôle des cellules NK dans les infections par LASV et EBOV. Ce modèle se base sur des approches *in vitro* déjà utilisées et maîtrisées au laboratoire. En effet, des outils ont déjà permis d'étudier les CPA infectées par LASV et MOPV mais également les interactions entre les DC infectées et les cellules T *in vitro*. Ce projet de thèse s'attache à étudier

l'activation des cellules NK au cours des interactions avec les CPA et de définir leur rôle dans le contrôle des infections par LASV et EBOV. D'après les résultats déjà publiés, on s'attend à une faible activation des cellules NK par les CPA infectées par ces virus pathogènes. Le modèle développé dans le cadre de cette thèse sur les interactions NK/CPA s'inscrit donc dans la continuité des études réalisées au laboratoire sur les réponses immunes induites lors de l'infection par des virus responsables de FH. Pour cela, les DC et macrophages ont été différenciés à partir des monocytes du sang par un cocktail de cytokines. Elles ont ensuite été infectées par les virus puis cultivées avec des cellules NK autologues. L'activation des cellules NK a été évaluée lors de l'infection, ainsi que la production de cytokines et la cytotoxicité.

En premier lieu, l'activation des cellules NK en réponse à LASV a été comparée avec celle induite lors de l'infection par MOPV, un autre Arénavirus très proche de LASV mais non pathogène chez l'homme et le PNH. La comparaison de LASV et MOPV, de pathogénie opposée, constitue un excellent modèle afin de déterminer les facteurs expliquant la différence de pathogénicité entre ces deux virus et de mieux comprendre les réponses immunitaires induites lors de la fièvre de Lassa et la pathogénèse. Les résultats déjà publiés au laboratoire ont montré que les macrophages sont fortement activés lors de l'infection par MOPV contrairement à ce qui est observé lors de l'infection par LASV. Ainsi, en présence de macrophages infectés par MOPV, une forte activation des cellules NK s'accompagnant de la lyse des cellules infectées et de la production de cytokines importante pour l'initiation de la réponse T est attendue. Comme les macrophages, les cellules NK pourraient alors participer à la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV. Les souches AV de LASV et AN21366 de MOPV ont été utilisées dans ces expériences. L'importance du contact cellulaire et des facteurs solubles sécrétés lors des interactions entre les cellules NK et les CPA a été analysée. Les résultats obtenus sont décrits dans la partie Résultats et sont également présentés dans un article de recherche apposé en annexe.

De plus, d'après les études précédentes, les IFN de type I sécrétés en grandes quantités par les macrophages lors de l'infection par MOPV, mais pas par LASV semblent impliqués dans la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV. La différence de production d'IFN de type I suggère également que ces cytokines seront probablement des médiateurs clé dans l'activation des cellules NK. Afin de mieux comprendre le rôle de la réponse IFN de type I dans l'activation des cellules NK, des LASV recombinants générés au laboratoire par génétique inverse ont été utilisés. Les virus doubles mutants LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A décrits précédemment ont été utilisés car ils induisent une production importante d'IFN de type I par les cellules infectées. Ces virus ont été comparés avec un LASV sauvage également obtenu par génétique inverse (LASV-Rec) et avec un recombinant LASV NP-R393A n'induisant d'une faible

production d'IFN de type I. Les cellules NK ont été cultivées avec des DC ou des macrophages infectés par ces virus mutants et l'activation des cellules NK, la production de cytokines et la cytotoxicité ont été évaluées. Nous avons ensuite analysé le rôle des IFN de type I sécrétés par les CPA en réponse aux LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A sur l'activation des cellules NK.

Enfin, nous avons analysé le rôle des cellules NK dans le contrôle de l'infection des DC et macrophages et sur l'induction des réponses immunes mises en place lors de l'infection par EBOV., Une souche Zaïre de l'épidémie de 2001 a été utilisée lors de l'infection par EBOV (ex-ZEBOV).

Ces travaux permettront de mieux comprendre les réponses immunitaires et les mécanismes de la pathogenèse mis en place lors des FH Lassa et Ebola mais également lors de l'infection par d'autres virus responsables de FH.

Résultats

Infection des cellules NK par LASV et MOPV

Nous avons étudié la susceptibilité des cellules NK à l'infection par LASV et MOPV. Pour cela, les cellules NK purifiées ont été mises en contact avec ces virus à une multiplicité d'infection (MOI) de 0, 1. Les surnageants récoltés les jours suivants ont été titrés afin d'analyser la capacité des cellules NK à répliquer les virus. Aucune particule infectieuse n'a été détectée dans les surnageants indiquant que les cellules NK n'étaient pas capables de produire des particules virales. Ensuite, nous avons étudié l'entrée et la réplication des virus par immunofluorescence. Aucune cellule NK infectée n'a été détectée, suggérant que LASV et MOPV n'étaient pas en mesure d'infecter cette population cellulaire.

Les cellules NK expriment les TLR₃, TLR₇ et TLR₈ qui permettent la détection de l'ARN viral endocyté. Nous avons analysé le statut d'activation des cellules NK au contact de LASV et MOPV de façon comparative avec celui observé lors de la stimulation par plusieurs molécules induisant l'activation des cellules NK (IL-2/phytohémagglutinine (PHA)) [431], la sécrétion d'IFN- γ (phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)/ionomycine ou IL-12/IL-18) ou la stimulation des TLR₃, TLR₇ et TLR₈ (par de l'acide polyinosinic:polycytidylic (Poly (I:C)), imiquimod et ssRNA₄₀ respectivement) [389, 391, 438].

La stimulation par l'IL-2/PHA induit une augmentation de l'expression de CD69, CD25 et de NKp30 et l'ajout d'un agoniste de TLR₇ entraîne aussi une augmentation de l'expression de CD69, cependant bien plus modeste. En revanche, une diminution modérée de l'expression de NKp30 et CXCR3 est observée en réponse à ce stimulus (figure 20A).

Par ailleurs, nous n'avons observé aucune activation des cellules NK en présence de LASV ou MOPV infectieux au regard de l'expression de CD69, HLA-DR et CD25 (figure 20A). L'expression des récepteurs activateurs NKp30, NKp44 et NKG2D et du récepteur inhibiteur CD158b n'est pas non plus modifiée. La présence de LASV ou MOPV n'induit pas non plus la prolifération des cellules NK au regard de l'expression de Ki67. En revanche, l'expression de CXCR3 a significativement augmenté au contact de LASV. Cela semble également être le cas en réponse à MOPV bien que les résultats ne soient pas significatifs. Les virus inactivés n'induisent aucune modulation de l'expression de CD69, NKp30, NKp44 et Ki67 (données non présentées) mais ils sont responsables de l'augmentation de l'expression de CXCR3 (figure 20A).

Ensuite, nous avons observé une absence de synthèse des gènes codant l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β en réponse à LASV et MOPV (figure 20B et données non présentées) alors que c'était le cas lors de la stimulation par une combinaison PMA/ionomycine.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de modification des capacités cytotoxiques des cellules NK au contact de LASV ou MOPV. En effet, l'expression de GrzB au niveau ARNm et protéine n'est pas modifiée en réponse à LASV, MOPV ou aux virus inactivés (figure 20C et données non présentées). Enfin, lors de l'ajout de cellules cibles K562 (sensibles à la lyse par les cellules NK car n'exprimant pas les molécules de CMH I), une augmentation de la dégranulation des cellules NK est mise en évidence par la détection de l'exposition de CD107a à la surface [439]. Cette observation suggère que les cellules NK sont fonctionnelles et capables de lyser les cellules K562. En revanche, le potentiel cytotoxique des cellules NK n'est pas modifié en présence de LASV ou MOPV (figure 20D).

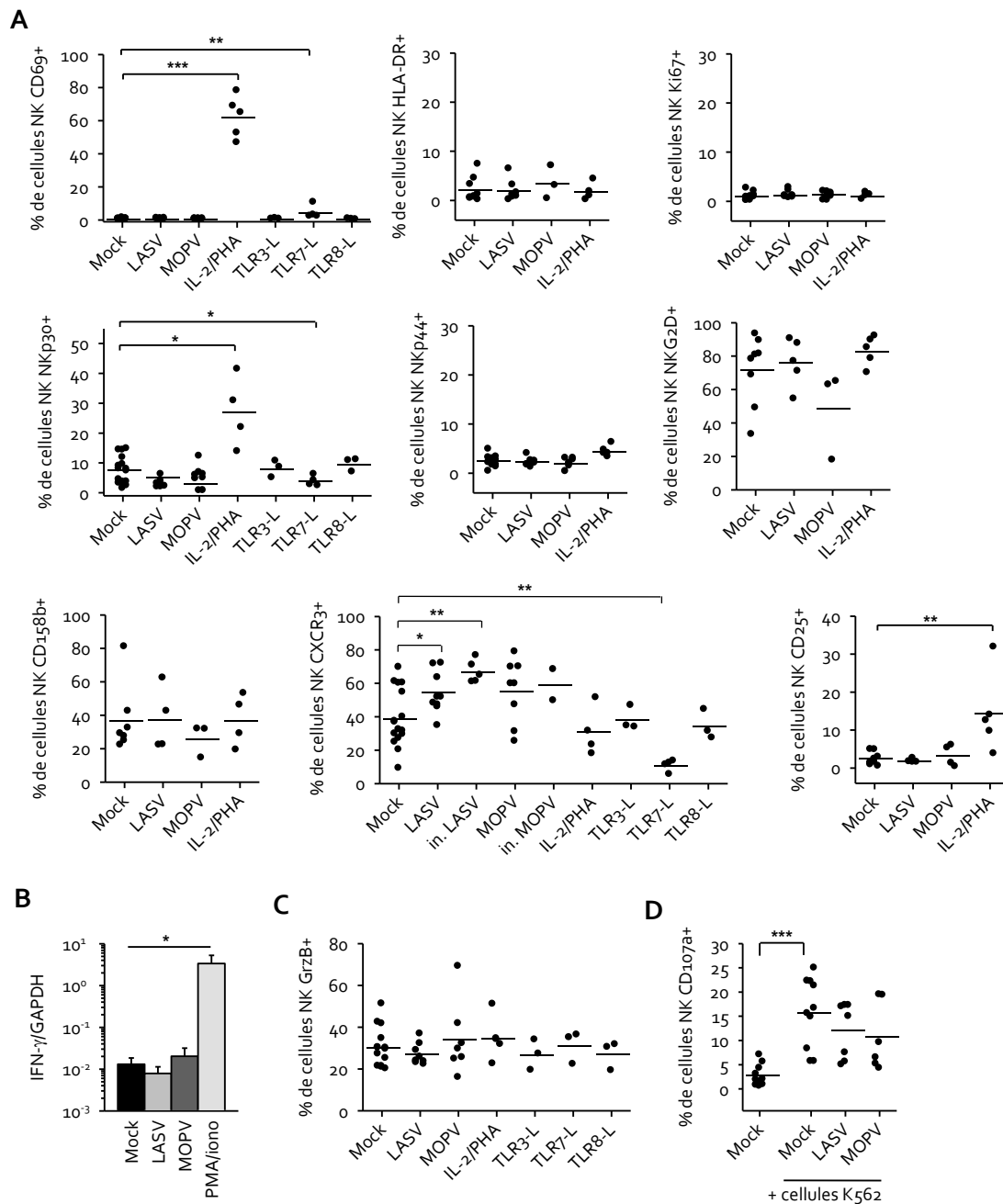


Figure 20. Infection des cellules NK par LASV et MOPV. Analyse de l'activation, de la prolifération (A), de la production de cytokines (B) et des capacités cytotoxiques (C et D) des cellules NK au contact de LASV et MOPV. Dans certaines conditions, du virus inactivé (in. LASV ou in. MOPV), de l'IL-2/PHA, du Poly (I:C) (TLR3-L), de l'imiquimod (TLR7-L) ou du ssRNA₄₀ (TLR8-L) ont été utilisés dans les cultures. **A.** Analyse de l'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKG2D, CD158b, CD25, CXCR3 à la surface des cellules NK ainsi que de l'expression intracellulaire de Ki67 par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. **B.** Analyse de la transcription d'IFN- γ par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Une combinaison PMA/ionomycine a été ajoutée dans les cultures dans certaines conditions. Les graphiques représentent la moyenne de 3 (MOPV et PMA/iono), 5 (LASV) et 11 (Mock) expériences et l'erreur standard est indiquée. **C.** Analyse de l'expression intracellulaire de GrzB par cytométrie en flux après 3 jours de culture. **D.** Analyse de la dégranulation des cellules NK (expression à la surface de CD107a) après 2 jours de culture. Des cellules cibles K562 ont été ajoutées dans certaines conditions. Analyse statistique par le test de Mann-Whitney : * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Nous avons ainsi pu conclure que la présence de LASV ou MOPV n'a pas d'influence sur l'activation et la prolifération des cellules NK, ni sur leur production de cytokines ou leur capacité cytotoxique. Une augmentation de CXCR3 est toutefois induite par LASV ou LASV inactivé.

Présentation du modèle *in vitro* de coculture NK/CPA

Un modèle de coculture de CPA primaires humaines avec des cellules NK autologues a été mis au point. Les conditions de préparation des cellules primaires et de coculture ont été comparées. La présence de cellules T, qui pourraient influencer sur les interactions NK/CPA, a été évitée par l'utilisation d'un kit de purification des monocytes (Miltenyi Biotech). Nous avons également préféré utiliser des cellules NK non activées. A cette fin, elles ont été congelées pendant le temps de la différenciation des monocytes en DC et macrophages plutôt que cultivées avec des quantités sub-optimales d'IL-2 ou IL-15. Le ratio optimal NK/CPA permettant une analyse précise a été déterminé. En effet, il a été montré que le ratio NK/CPA était important et qu'un ratio NK/DC proche de 5/1 conduisait à la lyse des DC immatures par les cellules NK [408]. Ainsi, un ratio NK/CPA de 1/5 a été utilisé pour analyser l'activation des cellules NK, leur prolifération, leur capacité cytotoxique et la production de cytokines. En revanche, un ratio NK/CPA de 5/1 nous a permis d'analyser l'activation des CPA infectées en présence de cellules NK. Ce même ratio a été utilisé afin d'évaluer l'influence des cellules NK sur la réplication virale lors des expériences de titrages des surnageants de coculture NK/CPA.

Une cinétique d'étude ainsi que des méthodes permettant une analyse rigoureuse, efficace et pouvant être réalisée au laboratoire P₄ ont été mises au point (figure 21). Les CPA ont été soit infectées avec nos stocks viraux produits sur VeroE6, soit mises en contact avec un surnageant de VeroE6 non infecté (Mock) puis cultivées en présence de cellules NK. Les durées de coculture appliquées avant de procéder aux différentes analyses ont été déterminées après avoir testé plusieurs temps. L'activation des cellules NK a été étudiée après 3 jours de coculture par analyse de l'expression des molécules de surfaces reflétant l'activation (CD69, CD25, NKp44, HLA-DR), des récepteurs activateurs (NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D), des récepteurs inhibiteurs (CD158b), des récepteurs de chemokines (CXCR3) et des molécules d'adhésion (CD62L) par cytométrie en flux. De même, l'activation des CPA a été étudiée après 3 jours de coculture en analysant l'expression des molécules de costimulation des cellules T (CD80, CD86, CD40), de présentation de l'antigène (HLA-DR, HLA-abc) et de ligands de récepteurs activateurs NK (Mic-A/B) après 3 jours de coculture. La prolifération des cellules NK a été évaluée par l'analyse de l'expression intracellulaire de Ki67 ainsi que par une technique d'incorporation de BrdU. La production de cytokines ou chemokines par les cellules NK (IFN- γ , TNF- α et TNF- β) et par les CPA (IFN- α ₁, IFN- α ₂, IFN- β , TNF- α , IL-1 β , IL12p35, IL12p40, IL-15, IL-18, CXC chemokines) a été analysée par RT-PCR en temps réel après un jour de coculture ou par tests ELISA et ELISpot.

Le potentiel cytotoxique des cellules NK a quant à lui été déterminé en analysant l'expression des molécules GrzB et Perforine par RT-PCR en temps réel (après 1 jour de coculture), cytométrie en flux intracellulaire (après 3 jours de coculture), tests ELISA ou ELISpot. L'expression des ARNm codant FasL et TRAIL a également été étudiée par RT-PCR en temps réel. Enfin, la lyse des cellules de la lignée K562 par les cellules NK a été quantifiée après 2 jours de coculture par l'analyse de l'expression à la surface de la molécule CD107a.

L'activation des cellules NK et des CPA a été comparée avec celle observée lors de la stimulation par des molécules activatrices. Le lipopolysaccharide (LPS) a ainsi été utilisé comme témoin positif d'activation des CPA. Les cellules NK ont quant à elles été directement activées avec une combinaison d'IL-2/PHA. Enfin, la sécrétion de cytokines par les cellules NK a été induite par l'addition de PMA/ionomycine ou d'IL-12/IL-18. Dans certaines conditions, les populations de cellules NK et de CPA ont été séparées par une membrane semi-perméable laissant passer les facteurs solubles, cette condition sera appelée « *Transwell* » par la suite. Dans d'autres conditions, les interactions entre les récepteurs et leurs ligands ont été inhibées en ajoutant des anticorps neutralisants lors de l'infection.

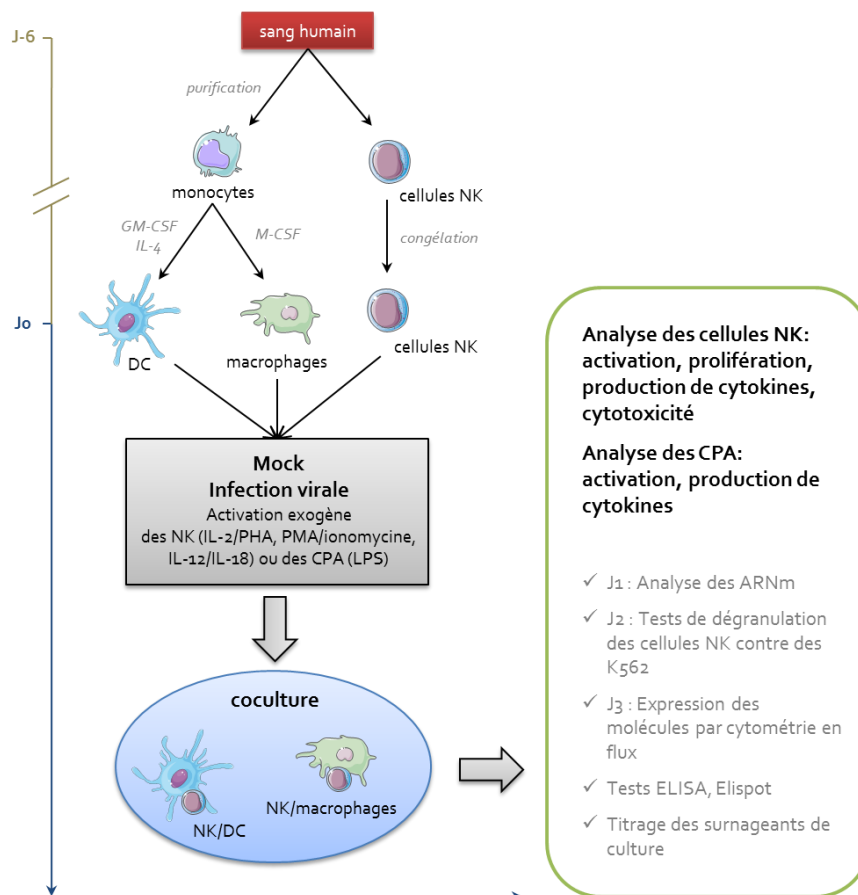


Figure 21. Représentation du modèle de coculture NK/CPA utilisé pour étudier le rôle des cellules NK dans le contrôle des infections LASV, MOPV et EBOV.

Coculture NK/CPA et infection par LASV et MOPV

Les résultats publiés au laboratoire avaient mis en évidence que les macrophages (contrairement aux DC) infectés par MOPV étaient activés et sécrétaient des IFN de type I. En revanche, l'activation était faible et ces cytokines n'étaient produites qu'en quantité limitée lors de l'infection par LASV [75, 217]. Le statut d'activation des CPA a été analysé dans notre modèle en présence de cellules NK et a été comparé à celui observé dans les cultures de CPA seules. L'expression des gènes des IFN de type I ainsi que de l'IL-12, IL-15 et IL-18 impliqués dans l'activation des cellules NK a également été analysée par RT-PCR en temps réel dans notre modèle de coculture NK/CPA. La production de TNF- α sera analysée dans la partie suivante. La production d'IFN- α et de CXCL11 a été analysée par test ELISA dans les cocultures NK/macrophages seulement.

Etat d'activation des DC et macrophages en présence de cellules NK

A l'instar des DC infectées par LASV ou MOPV et cultivées seules, la présence des cellules NK ne conduit pas à l'activation des DC. En effet, l'expression des molécules CD40, CD80, CD86, CD83, HLA-DR (CMH II), HLA-abc (CMH I) et Mic-A/B (ligand de NKG2D) n'est pas modifiée à la surface des DC seules ou dans les cocultures NK/DC (données non présentées). L'infection par LASV ou MOPV n'induit pas non plus la transcription des gènes IFN- β , IFN- α_1 , IFN- α_2 et IL-12p35, IL-12p40, IL-15 et IL-18 dans les cocultures NK/DC (données non présentées).

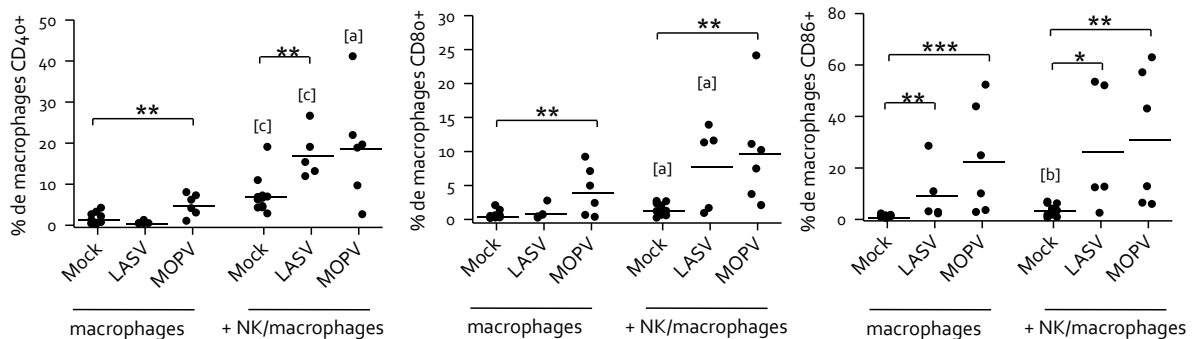
Ainsi, la présence de cellules NK ne permet pas de modifier la réponse des DC à l'infection par LASV et MOPV.

Comme cela avait déjà été montré [75, 217], une augmentation de l'expression des molécules CD40, CD80 et CD86 est observée à la surface des macrophages infectés par MOPV ainsi qu'une augmentation de l'expression de CD86 lors de l'infection par LASV, lorsque les macrophages étaient cultivés seuls (figure 22A). En revanche, dans notre modèle de coculture avec les cellules NK, la proportion de macrophages exprimant les molécules CD40, CD80 et CD86 est augmentée lors de l'infection par MOPV et aussi par LASV. L'expression des molécules HLA-DR, HLA-abc et Mic-A/B n'est pas modifiée à la surface des macrophages seuls ou en présence de cellules NK (données non présentées). L'infection par MOPV mais pas par LASV conduit à une synthèse modérée d'ARNm codant IFN- β , IFN- α_1 et IFN- α_2 (données non présentées). En revanche, la transcription des gènes IL-12p35, IL-12p40, IL-15 et IL-18 n'est pas modulée dans les cocultures NK/macrophages lors de l'infection par LASV ou MOPV. Enfin, les ELISA révèlent que les macrophages infectés par MOPV

sécrètent des quantités significatives d'IFN- α et de CXCL11 en présence de cellules NK alors ces taux sont réduits lors de l'infection par LASV (figure 22B).

En revanche, la présence de cellules NK induit l'augmentation significative de l'activation des macrophages infectés par MOPV par rapport à la réponse des macrophages infectés seuls. De façon surprenante, la présence des cellules NK conduit à une activation des macrophages infectés par LASV quasi similaire à la réponse observée avec MOPV, alors que les macrophages infectés seuls ne sont pas du tout activés. Donc, les cellules NK semblent capables d'induire une augmentation de l'activation des macrophages infectés par LASV et MOPV.

A



B

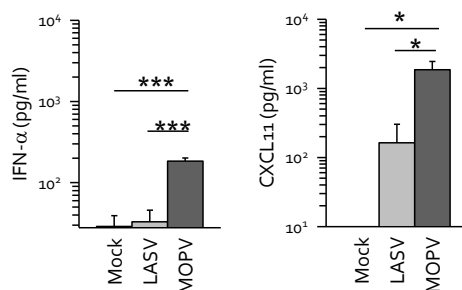


Figure 22. Analyse de l'activation et de la sécrétion d'IFN- α et CXCL11 par les CPA infectées ou non (Mock) par LASV ou MOPV après 3 jours de culture, en l'absence ou en présence de cellules NK (ratio NK/CPA de 5/1). **A.** L'expression des molécules CD40, CD80 et, CD86 à la surface des macrophages a été analysée par cytométrie en flux. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. **B.** Analyse de la sécrétion d'IFN- α et CXCL11 dans les surnageants de cocultures NK/macrophages par ELISA. Les graphiques représentent la moyenne de 4 expériences et l'erreur standard est indiquée. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney. Les conditions LASV et MOPV ont été comparées avec les conditions Mock (barres et *, ** ou ***) ainsi que les conditions dans les cocultures NK/macrophages avec les mêmes conditions dans les cultures de macrophages seuls ([a], [b] et [c]) : * ou [a] : $p \leq 0,05$, ** ou [b] : $p \leq 0,01$, *** ou [c] : $p \leq 0,001$.

Activation/prolifération des cellules NK en présence de CPA infectées par LASV et MOPV

Afin d'étudier la capacité des CPA infectées par LASV et MOPV à moduler l'activation des cellules NK, les DC et macrophages ont été infectés par LASV ou MOPV puis cultivés avec des cellules NK autologues. L'activation et la prolifération des cellules NK a été analysée trois jours après l'infection par cytométrie en flux.

⇒ Expression des molécules de surface du répertoire NK

Les DC stimulées par du LPS (DC-LPS) induisent une augmentation significative de l'expression de CD69 et CD25 et une diminution de l'expression de NKG2D et CXCR3 à la surface des cellules NK. De même, les cocultures NK/DC stimulées par l'IL-2/PHA montrent une augmentation de l'expression de CD69, CD25 et NKp30 ainsi qu'une diminution de l'expression de NKG2D et CXCR3 (figure 23A). En revanche, aucune modulation de l'expression de CD69, de HLA-DR, des récepteurs activateurs (NKp30, NKp44, NKp46 et NKG2D), du récepteur inhibiteur (CD158b), du récepteur de cytokine CD25 et du récepteur de chemokines CXCR3 n'est détectée à la surface des cellules NK cultivées en présence de DC infectées par LASV ou MOPV (figure 23A). Cette observation suggère ainsi que les cellules NK ne sont pas activées en présence de DC infectées par LASV ou MOPV.

Les macrophages stimulés par du LPS (macrophages-LPS) induisent une augmentation significative de l'expression de CD69, HLA-DR, NKp44 et CD25 et une diminution de l'expression de NKp30, NKG2D et CXCR3 à la surface des cellules NK. Dans les cocultures NK/macrophages, la stimulation des cellules NK par l'IL-2/PHA entraîne également une augmentation significative de l'expression de CD69, HLA-DR et CD25 ainsi qu'une diminution de l'expression de NKG2D et CXCR3. En présence de macrophages infectés par LASV ou MOPV, le nombre de cellules NK exprimant CD69, NKp30, NKp44 (lors de l'infection par LASV seulement) augmente de façon significative (figure 23B et C). Toutefois, l'expression de HLA-DR, NKp46, NKG2D, CD158b et CD25 par les cellules NK reste inchangée. Malgré une diminution de l'expression de CXCR3 à la surface des cellules NK en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV, l'analyse des quantités d'ARNm codant CXCR3 n'a révélée aucune différence entre les cocultures Mock et infectées (données non présentées).

De plus, aucun changement dans l'expression de la plupart des molécules du répertoire NK n'est observé en présence de macrophages stimulés par les virus inactivés suggérant que la modification du répertoire des cellules NK est liée à la réplication virale dans les macrophages (figure 23B). L'infection des macrophages par du LASV inactivé induit cependant une diminution significative de NKp30 et une augmentation de CXCR3 à la surface des cellules NK (figure 23B).

⇒ *Prolifération des cellules NK*

La prolifération des cellules NK a été évaluée en analysant l'expression intracellulaire de Ki67 (figure 23A, B et C).

Aucune modulation de l'expression de Ki67 n'est observée en présence de DC infectées par LASV ou MOPV. Les DC-LPS ne semble pas induire la prolifération des cellules NK. En revanche, elles prolifèrent lors de la stimulation par l'IL-2/PHA dans les cocultures NK/DC.

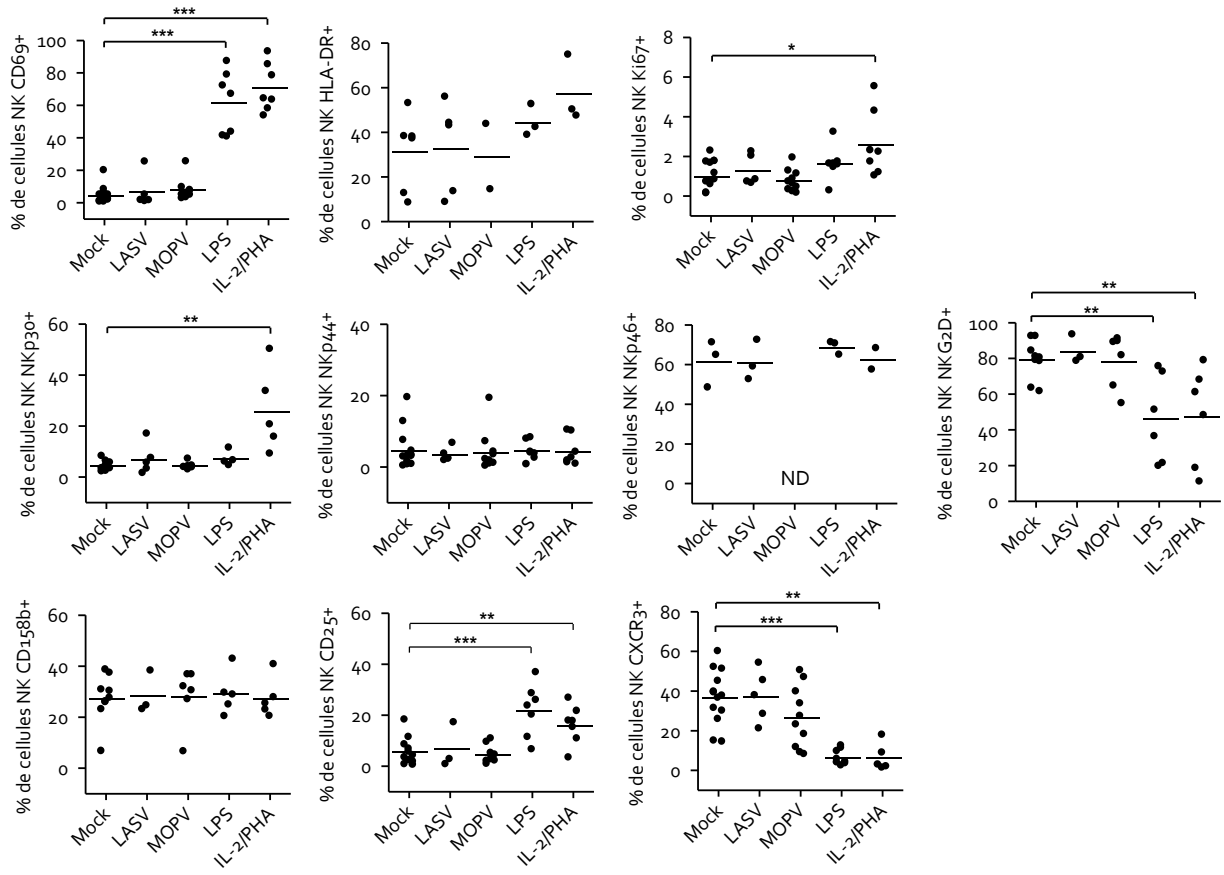
Contrairement aux DC, les macrophages infectés par LASV ou MOPV induisent la prolifération des cellules NK. En revanche, les cellules NK ne semblent pas proliférer en réponse aux macrophages-LPS ainsi que les cocultures NK/macrophages stimulés par de l'IL-2/PHA.

Des résultats similaires ont également été observés par incorporation de BrdU (données non présentées) mais le peu d'expériences réalisées n'a pas permis de réaliser des statistiques rigoureuses.

Les résultats démontrent que les cellules NK sont fortement activées et prolifèrent en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV, mais pas en présence de DC infectées.

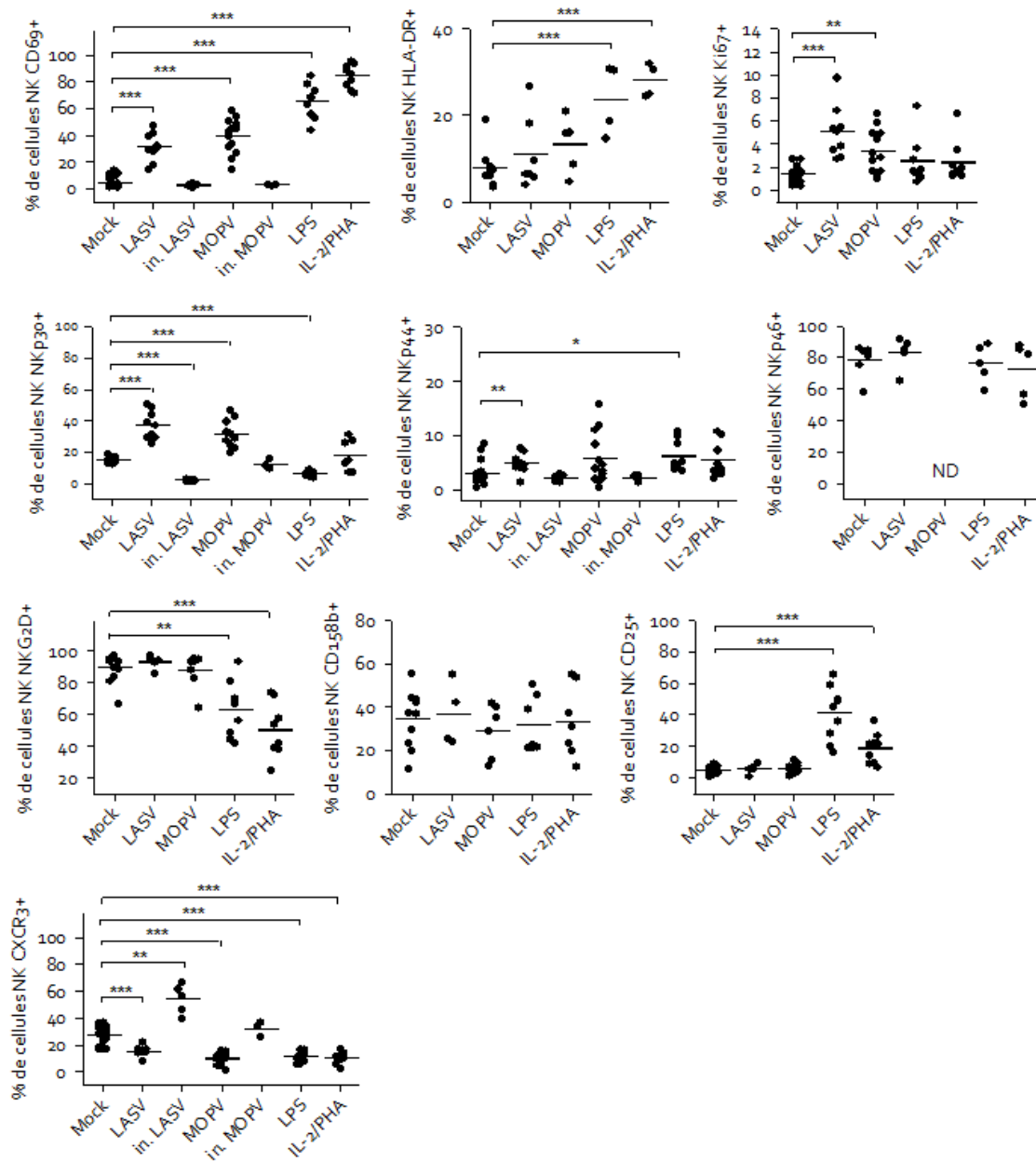
A

NK/DC



B

NK/macrophages



C

NK/macrophages

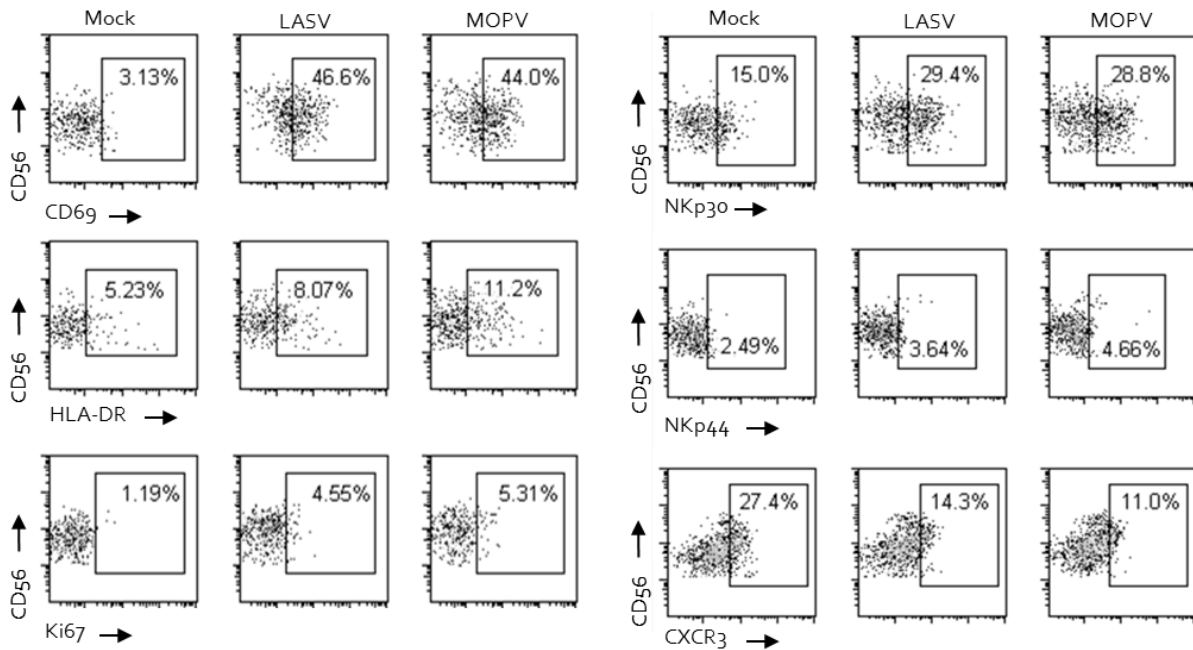


Figure 23. Analyse de l'activation et de la prolifération des cellules NK en présence de DC (A) ou de macrophages (B) infectés ou non (Mock) par LASV, MOPV ou stimulées par les virus inactivés (ratio NK/CPA de 1/5) après 3 jours de culture. Le LPS et l'IL-2/PHA ont été utilisés pour induire directement l'activation des CPA ou des cellules NK, respectivement. L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD158b, CD25 et CXCR3 a été analysée à la surface des cellules NK par cytométrie en flux, ainsi que l'expression intracellulaire de Ki67. A et B. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney: *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. ND: non déterminé. C. Exemples de dot plots de cytométrie obtenus lors de l'analyse des cocultures NK/macrophages.

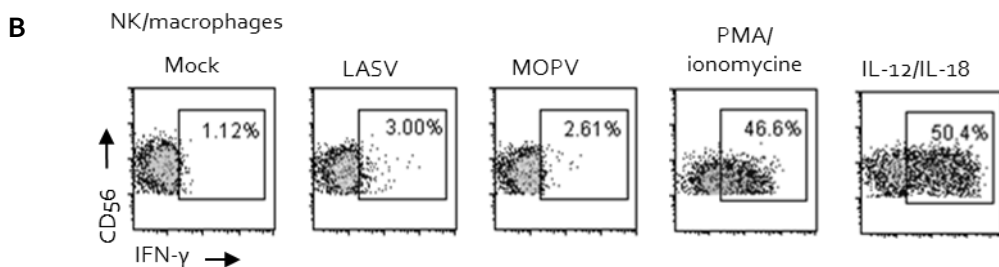
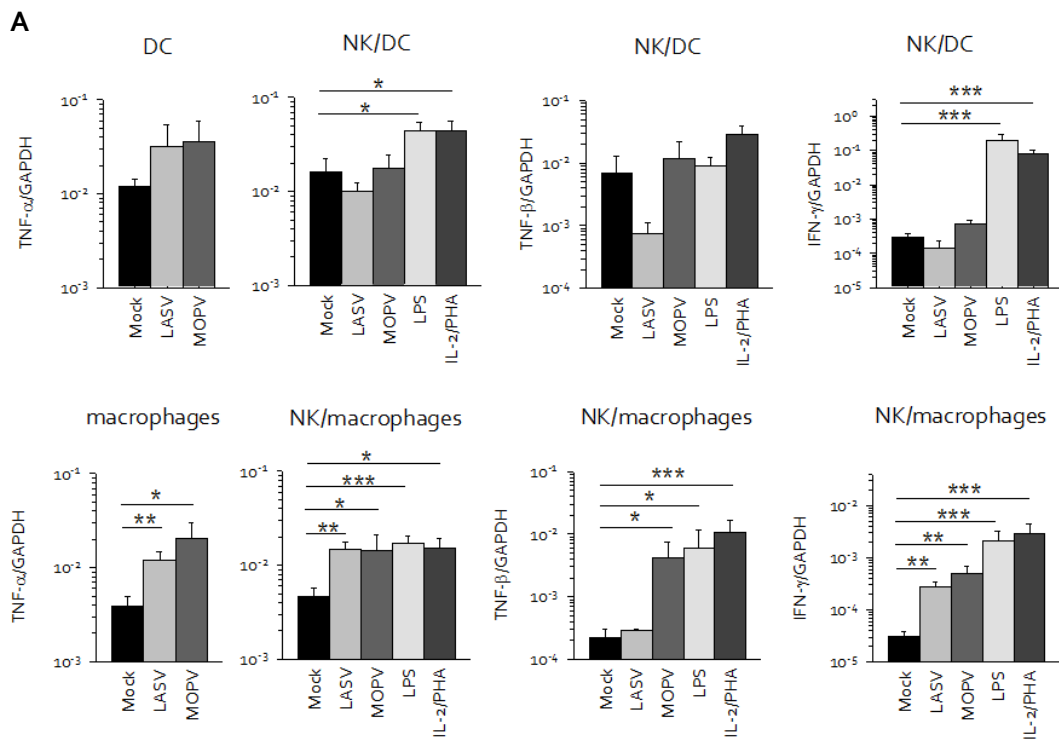
Production de cytokines par les cellules NK

La production de cytokines par les cellules NK purifiées et cultivées avec les CPA a ensuite été étudiée par l'analyse de la transcription des gènes par RT-PCR en temps réel, la détection de la présence de cytokines intracellulaires par cytométrie en flux et dans les surnageants de culture par ELISA et ELISpot.

Contrairement aux DC, les macrophages infectés par LASV et MOPV induisent la transcription d'ARNm codant l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β par les cellules NK (figure 24A). Cependant, les quantités de protéines détectées dans les cellules NK et dans les surnageants de coculture NK/macrophages étaient très faibles (figure 24B et C et données non présentées).

Une augmentation de la transcription et la sécrétion de l'IFN- γ par les cellules NK en présence de DC-LPS et macrophages-LPS est observée (figure 24A et C). La stimulation IL-2/PHA induit une augmentation significative de la synthèse des ARNm codant l'IFN- γ et la sécrétion de l'IFN- γ (figure 24 A et C). De même, l'ajout de PMA/ionomycine ou l'IL-12/IL-18 dans les cultures de cellules NK seules et dans les cocultures NK/macrophages induisait la production d'IFN- γ alors que le TNF- α était produit uniquement lors de la stimulation PMA/ionomycine (figure 24B et données non présentées).

Ces résultats montrent que les cellules NK ne produisent que très peu d'IFN- γ , de TNF- α ou de TNF- β en présence de DC ou de macrophages infectés par LASV et MOPV.



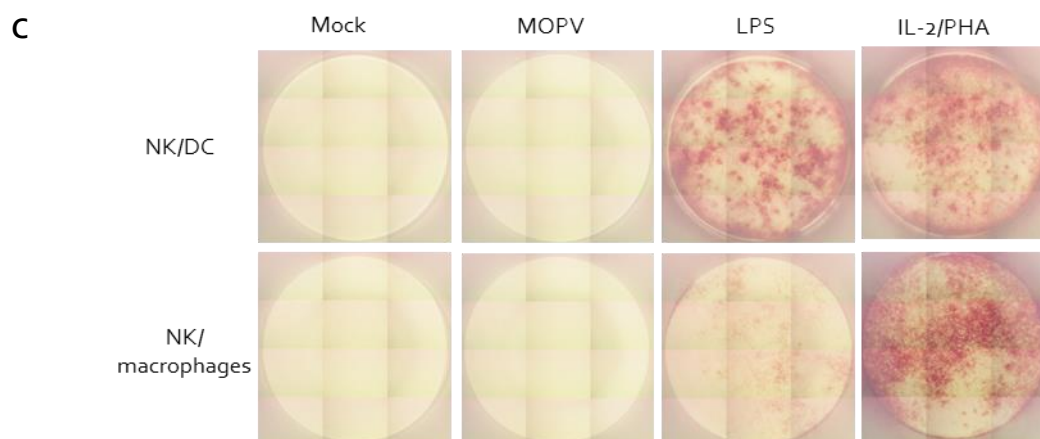


Figure 24. Analyse de la production de cytokines par les cellules NK purifiées et cultivées avec des DC ou macrophages infectés ou non (Mock) par LASV ou MOPV à un ratio NK/CPA de 1/5. Dans certaines conditions, les CPA ont été activées par du LPS et les cellules NK par de l'IL-2/PHA, PMA/ionomycine ou IL-12/IL-18. **A.** Analyse de la transcription des gènes TNF- α (CPA seules et NK/CPA), TNF- β et IFN- γ (NK/CPA) par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Les graphiques représentent la moyenne de 3 à 9 expériences (DC) et de 5 à 11 (MP) et l'erreur standard. **B.** Exemple de dot plot obtenu lors de l'analyse de l'expression d'IFN- γ par cytométrie en flux intracellulaire après 2 jours de culture. **C.** Exemple de test ELISpot permettant la détection de la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK en coculture. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney : ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.

Fonctions cytotoxiques

Les capacités cytotoxiques des cellules NK ont été étudiées par l'analyse de l'expression de GrzB, Perforine, FasL et TRAIL par RT-PCR en temps réel, cytométrie en flux intracellulaire, tests ELISA ou ELISpot selon les molécules analysées.

Les DC-LPS augmentent la synthèse des ARNm codant GrzB par les cellules NK. L'IL-2/PHA active également la production de GrzB par les cellules NK (ARNm et protéines) en présence de DC. Les DC infectées par LASV ou MOPV n'induisent pas l'augmentation de la synthèse de GrzB et Perforine au niveau ARNm ou protéine (figure 25A et B). En revanche, les DC infectées n'induisent pas non plus la dégranulation des cellules NK en présence de cellules K562 comme en témoigne l'exposition à la surface de CD107a (figure 25C).

La présence de macrophages infectés par MOPV semble induire la synthèse d'ARNm GrzB au (figure 25A). L'expression de GrzB est augmentée au niveau protéique de façon significative dans les cellules NK en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV (figure 25B et E). Les macrophages-LPS induisent l'augmentation des taux d'ARNm et de protéine intracellulaire de GrzB, tout comme la stimulation par l'IL-2/PHA dans les cocultures NK/macrophages. Les taux de

Perforine (ARNm et protéine) ne sont pas modulés dans les cocultures NK/macrophages lors de l'infection par les deux virus. Une augmentation significative des niveaux d'ARNm de FasL et TRAIL est en revanche observée dans les cocultures NK/macrophages lors de l'infection par LASV ou MOPV (figure 25A). Une augmentation significative de la dégranulation des cellules NK est détectée en réponse à des cellules K562 en présence de macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV (figure 25C), tout comme lors de la stimulation par l'IL-2/PHA. Les cellules K562 ne sont pas lysées par les cellules NK en présence de macrophages infectés par des virus inactivés, confirmant la nécessité d'une réplication virale dans les macrophages pour induire l'augmentation du potentiel cytotoxique des cellules NK.

Ainsi, les cellules NK acquièrent des propriétés cytotoxiques en présence de macrophages, mais pas en présence de DC, lors de l'infection par LASV ou MOPV.

⇒ *Analyse de La Lyse des CPA infectées*

Nous avons ensuite déterminé si les cellules NK étaient capables de lyser les CPA infectées dans les cocultures.

Nous n'avons observé aucune différence d'exposition de CD107a à la surface des cellules NK cultivées avec des CPA infectées ou non par LASV ou MOPV (en l'absence de cellules K562), suggérant que les cellules NK ne sont pas capables de lyser les CPA infectées (figure 25C). Les particules virales infectieuses produites par les CPA ont ensuite été quantifiées en présence ou non de cellules NK. Dans chacune de nos expériences, la réplication de LASV et MOPV dans les DC et macrophages était plus importante en présence de cellules NK. Ces différences n'étaient cependant pas significatives du fait de la grande variabilité des expériences (figure 25D). La réplication de LASV semblait par contre être réduite à partir de 3 jours de coculture NK/macrophages. Il est à noter que les titres viraux sont similaires dans les cultures de CPA seules et dans les cocultures NK/CPA lors de la stimulation par l'IL-2/PHA (données non présentées). De plus, des études de la viabilité des CPA en présence de cellules NK par un marquage Annexin-V/7AAD n'a pas permis de mettre en évidence une différence de la mort cellulaire dans les cultures infectées ou non (données non présentées).

Malgré l'augmentation des capacités cytotoxiques des cellules NK en présence de macrophages infectés par LASV ou MOPV, les cellules NK ne semblent pas être capables de lyser les CPA infectées ni de contrôler la réplication virale.

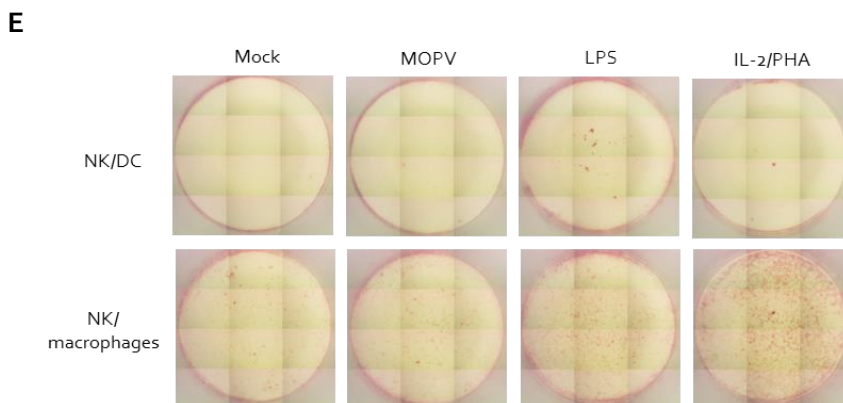
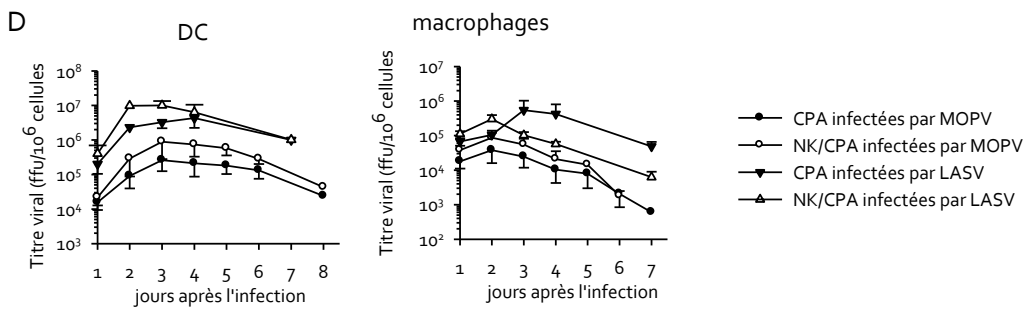
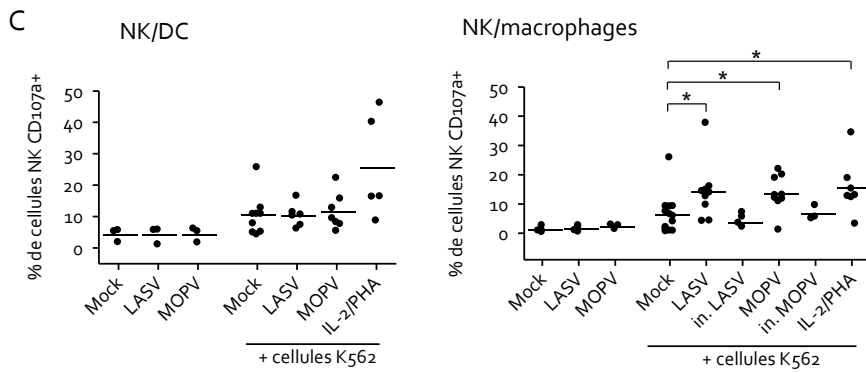
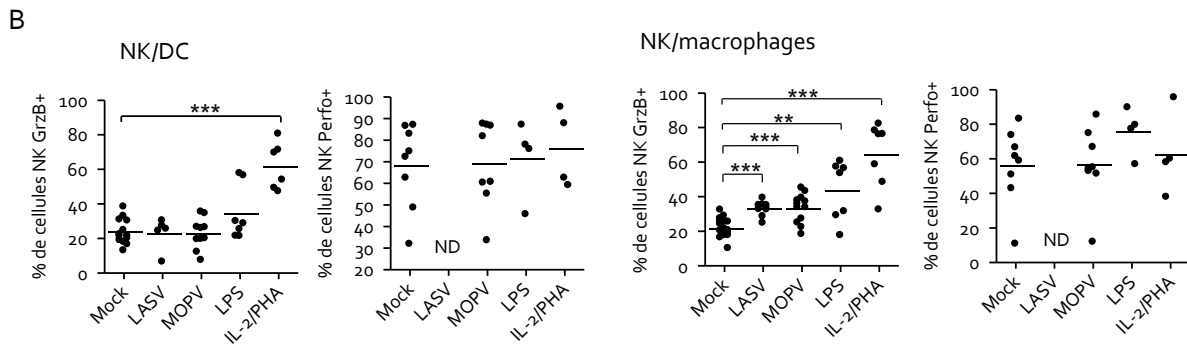
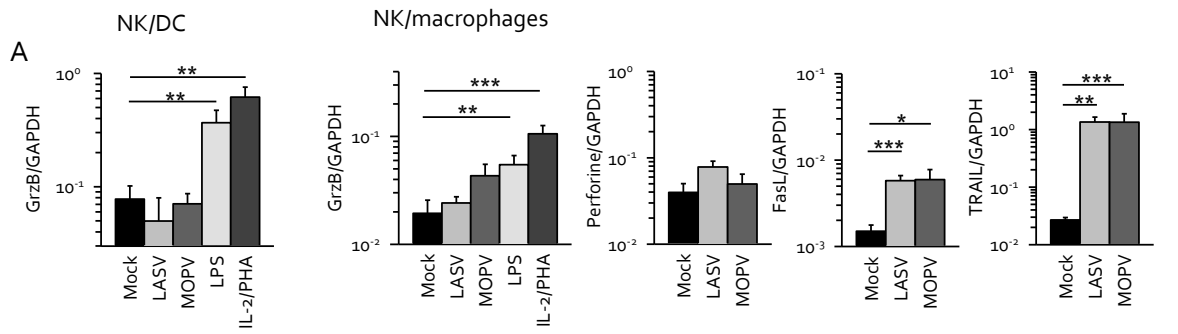


Figure 25. Etude des capacités cytotoxiques des cellules NK cultivées avec des DC ou des macrophages infectés ou non (Mock) par LASV ou MOPV à un ratio NK/CPA de 1/5 (**A**, **B**, **C** et **E**) ou 5/1 (**D**). Dans certaines conditions, les CPA ont été activées par du LPS et les cellules NK par de l'IL-2/PHA. **A.** Analyse de la transcription des gènes GrzB (NK/DC et NK/macrophages), Perforine, FasL et TRAIL (NK/macrophages) par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Les graphiques représentent la moyenne de 3 à 10 expériences et l'erreur standard. **B.** Analyse de l'expression de GrzB et Perforine par cytométrie en flux intracellulaire après 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. ND : non déterminé. **C.** Analyse de la dégranulation des cellules NK (expression à la surface de CD107a) après 2 jours de culture. Des cellules cibles K562 ont été ajoutées dans certaines conditions. **D.** Titrage des virus dans les surnageants de culture de CPA seules ou de cocultures NK/CPA. Les graphiques représentent la moyenne de 5 à 6 expériences et l'erreur standard. **E.** Exemple de la sécrétion de GrzB par les cellules NK en coculture déterminée par ELISpot. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney: * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.

Etude de l'importance du contact cellulaire dans les interactions NK/macrophages

Nous avons analysé l'importance des contacts entre les cellules NK et les macrophages. Pour cela, les deux populations en coculture ont été séparées par une membrane semi-perméable empêchant le contact cellulaire mais permettant le passage de molécules solubles (« *Transwell* »). Les résultats obtenus dans les cocultures « *Transwell* » NK/macrophages ont été comparés avec ceux décrits précédemment et reportés dans la figure 26A. L'expression de CD69 ou des récepteurs activateurs NKp30 et NKp44 n'est plus augmentée à la surface des cellules NK lors de l'infection des macrophages par LASV et MOPV par rapport à ce qui a été décrit précédemment. De même, la prolifération des cellules NK est abolie. L'inhibition du contact cellulaire empêche également l'augmentation de l'expression de GrzB et de la lyse des cellules K562 par les cellules NK. Seule l'expression de CXCR3 à la surface des cellules NK reste modifiée dans les cultures « *Transwell* ».

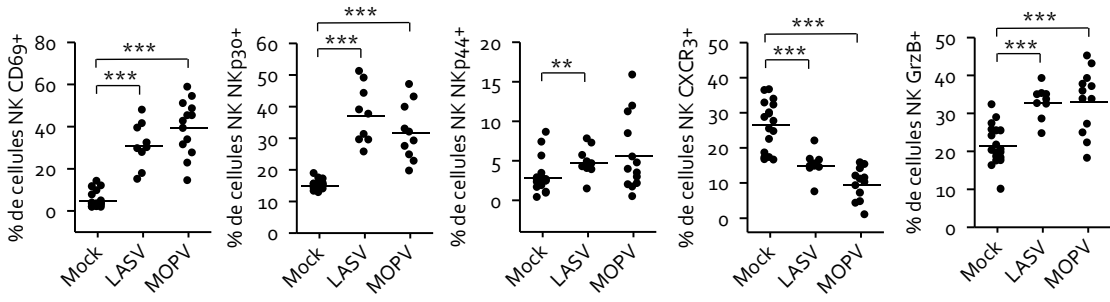
Les contacts cellulaires entre les cellules NK et les macrophages infectés par LASV ou MOPV sont donc essentiels pour l'activation des cellules NK et permettent d'augmenter la cytotoxicité. Au contraire, ils ne semblent avoir aucun rôle dans la modulation de l'expression CXCR3.

Afin de déterminer plus précisément les molécules impliquées dans l'activation des cellules NK, des anticorps neutralisants ont été utilisés pour inhiber l'engagement de certains récepteurs des cellules NK avec leur ligand (figure 26B). Un anticorps IgG2a de spécificité inconnue a été utilisé comme contrôle. La modulation de l'expression de CD69, NKp30, CXCR3 et GrzB n'est pas altérée en présence des anticorps neutralisants CD40L et NKG2D en comparaison avec l'IgG2a contrôle. Malgré le petit nombre d'expériences réalisées, il s'est avéré qu'en présence des anticorps dirigés contre les NCR (NKp30, NKp44 et NKp46), seule l'expression de CD69 demeurerait augmentée tandis que l'expression de NKp30 et GrzB ne semblait plus modulée.

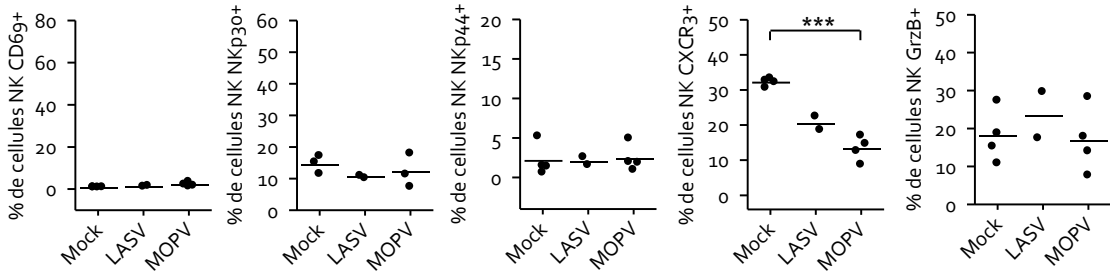
Donc, l'engagement de CD40L ou des récepteurs activateurs ne semble pas influencer sur l'activation des cellules NK en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV compte tenu de l'expression de CD69. En revanche, l'engagement des NCR pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'expression de NKp30 et GrzB par des cellules NK.

A

NK/macrophages



"Transwell" NK/macrophages



B

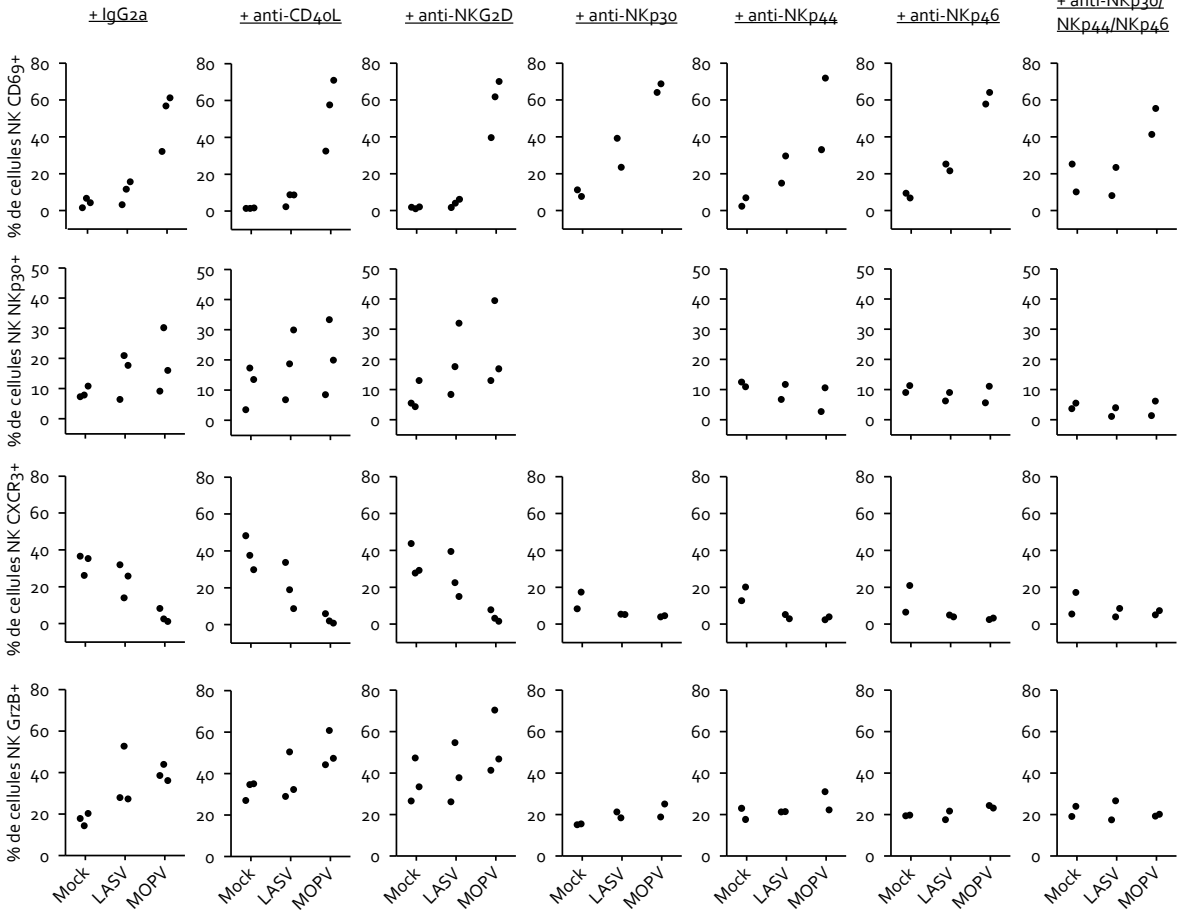


Figure 26. Analyse des contacts cellulaires dans les cocultures NK/macrophages. Les cellules NK ont été cultivées en présence de macrophages infectés ou non (Mock) par LASV ou MOPV à un ratio NK/macrophages de 1/5 **A.** Les cellules NK et les macrophages ont été séparés par une membrane semi-perméable (« Transwell »). Les résultats ont été comparés avec ceux décrits précédemment et reporté ici. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. **B.** L'interaction entre ces deux populations a été inhibée par des anticorps neutralisants CD40L, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46. Un anticorps IgG2a de spécificité inconnue a été utilisé comme contrôle. L'expression des molécules CD69, NKp30, NKp44, CXCR3 à la surface des cellules NK et l'expression intracellulaire de GrzB ont été analysées par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Analyse statistique par les tests de Mann-Whitney et Student : * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$ *** : $p \leq 0,001$.

Etude du rôle des facteurs solubles dans les interactions NK/macrophages

Lors du développement des réponses immunitaires, les IFN de type I participent à l'activation des cellules NK. Afin de déterminer leur rôle dans les interactions NK/macrophages, ils ont été inhibés par une combinaison d'anticorps neutralisants anti-IFNAR et anti-IFN- α (figure 27). Des anticorps ont également été utilisés pour bloquer l'engagement de CXCR₃ avec les chemokines CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁ qui sont notamment sécrétées en réponse aux IFN de type I et II. CXCR₃ a été directement inhibé par un anticorps anti-CXCR₃ ou bien l'action des chemokines a été bloquée par une combinaison d'anticorps dirigés contre CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁. Un anticorps contrôle IgG_{2a} a été utilisé comme anticorps de référence.

Lorsque les IFN de type I sont inhibés, l'augmentation de l'expression de CD69 et NKp30 par les cellules NK est moindre qu'avec l'anticorps contrôle plus particulièrement lors de l'infection par MOPV. Cependant, la neutralisation des IFN de type I n'altère pas la diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK. Cette diminution est toutefois plus modérée qu'en présence de l'IgG_{2a}. Nous avons par ailleurs observé une augmentation globale de l'expression de CXCR₃ dans toutes les conditions lorsque la réponse IFN de type I est inhibée. La prolifération des cellules NK et l'augmentation de l'expression intracellulaire de GrzB en présence de macrophages infectés par LASV ou MOPV sont également inhibées après neutralisation des IFN de type I.

Lors de la neutralisation de CXCR₃, les cellules NK restent activées (augmentation de l'expression de CD69 et NKp30, de la prolifération et de l'expression de GrzB). L'utilisation d'une combinaison d'anticorps dirigés contre CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁ a donné des résultats similaires. En outre, ces anticorps induisent une diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK mais moins importante qu'avec l'IgG_{2a} contrôle.

Nos résultats démontrent que les IFN de type I sécrétés par les macrophages infectés par MOPV, et dans une moindre mesure LASV, et sont nécessaires à l'activation des cellules NK alors que les chemokines CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁ semblent avoir un rôle plus mineur.

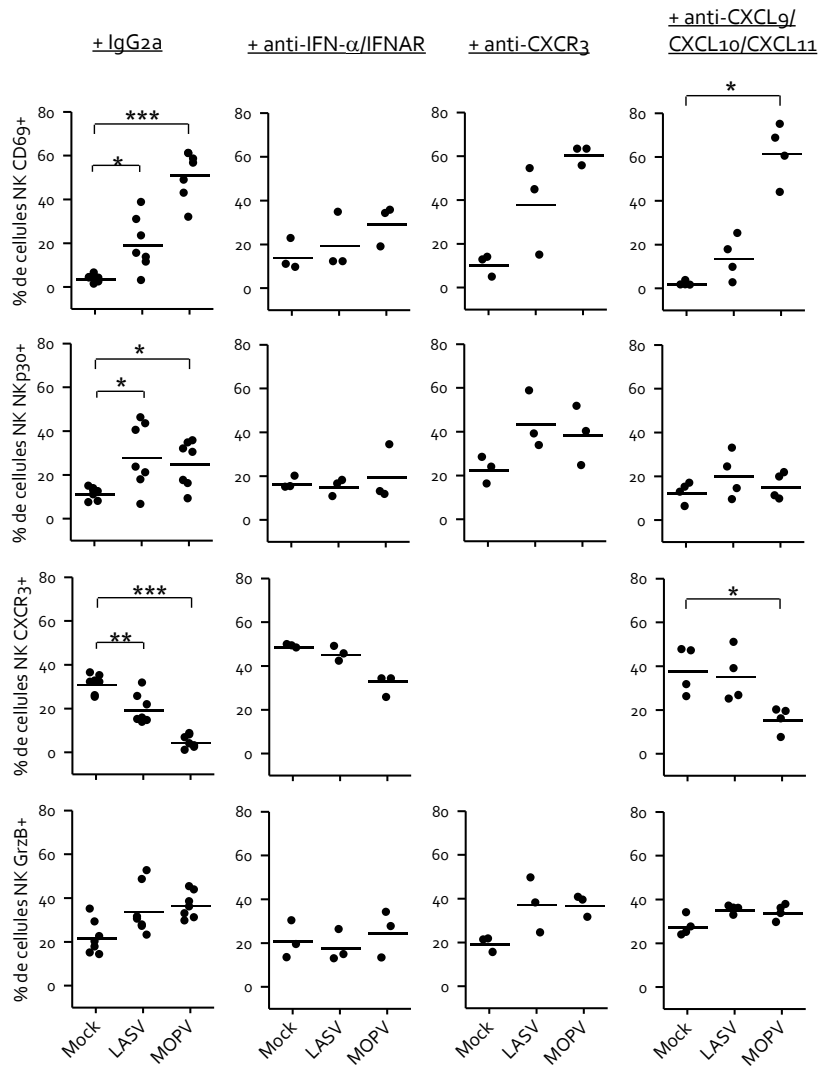


Figure 27. Les cellules NK ont été cultivées en présence de macrophages infectés ou non (Mock) par LASV ou MOPV à un ratio NK/macrophages de 1/5. L'action des IFN de type I a été inhibée par une combinaison d'anticorps neutralisants IFN- α et IFNAR (anti-IFN- α /IFNAR). L'engagement de CXCR3 a été bloqué par un anticorps neutralisant CXCR3. L'action des chemokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 a été inhibée par une combinaison d'anticorps neutralisants CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (anti-CXCL9/CXCL10/CXCL11). Un anticorps IgG2a de spécificité inconnue a été utilisé comme contrôle. L'expression des molécules CD69, NKp30, NKp44, CXCR3 à la surface des cellules NK et l'expression intracellulaire de GrzB ont été analysées par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. Analyse statistique par les tests de Student et de Mann-Whitney : * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.

Utilisation de LASV recombinants pour l'étude du rôle des IFN de type I

Des LASV recombinants NP-R393A, NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A générés au laboratoire par génétique inverse [174] ont été utilisés afin de disséquer le rôle de la réponse IFN de type I dans l'activation des cellules NK. Ces virus ont été comparés avec un LASV identique à la souche sauvage également obtenu par génétique inverse (LASV-Rec). La technique d'obtention de ces virus est décrite dans la partie Introduction. Il a été montré que LASV-Rec se comporte exactement comme LASV sauvage et en particulier, n'induit pas de production d'IFN de type I par les DC ou les macrophages. En revanche, les LASV NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A se répliquent plus faiblement dans les CPA et induisent une production importante d'IFN de type I par les macrophages. Comme LASV-Rec, LASV NP-R393A n'induit qu'une très faible synthèse des gènes des IFN de type I [174].

L'activation des CPA (expression des molécules de costimulation des cellules T, de présentation de l'antigène, du CMH I, des ligands des récepteurs activateurs NK et production de cytokines) en réponse aux LASV recombinants NP-R393A, NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A a été étudiée au laboratoire en commun avec Stéphanie Reynard. Les résultats ne seront pas tous détaillés ici car ils seront présentés prochainement dans le cadre d'un mémoire EPHE (S. Reynard).

Etat d'activation des DC et macrophages infectés par des LASV recombinants

Lors de l'infection par LASV NP-R393A, il n'a pas été observé d'activation des DC et des macrophages.

En revanche, nous avons observé que l'infection des macrophages mais aussi des DC par les LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A induit une forte activation cellulaire au regard de l'augmentation significative de l'expression de CD80, CD83, CD86, CD40 (données non présentées). L'expression de HLA-abc augmente à la surface des macrophages mais cela semble être moins marqué pour les DC. L'expression de HLA-DR diminue à la surface des macrophages et l'expression de Mic-A/B ne semble pas être modifiée de façon majeure à la surface des DC et des macrophages lors de l'infection par ces deux virus double mutants. Enfin, l'infection par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A semble induire la transcription des gènes IL-12p35, IL-12p40, IL-15 par les DC et macrophages et IL-18 par les macrophages seulement (données non présentées).

Dans notre modèle de coculture NK/CPA, ces mêmes résultats ont été observés (données non présentées) suggérant que les cellules NK n'influaient pas sur l'activation des DC et des macrophages.

Activation des cellules NK par les CPA infectées par des LASV recombinants

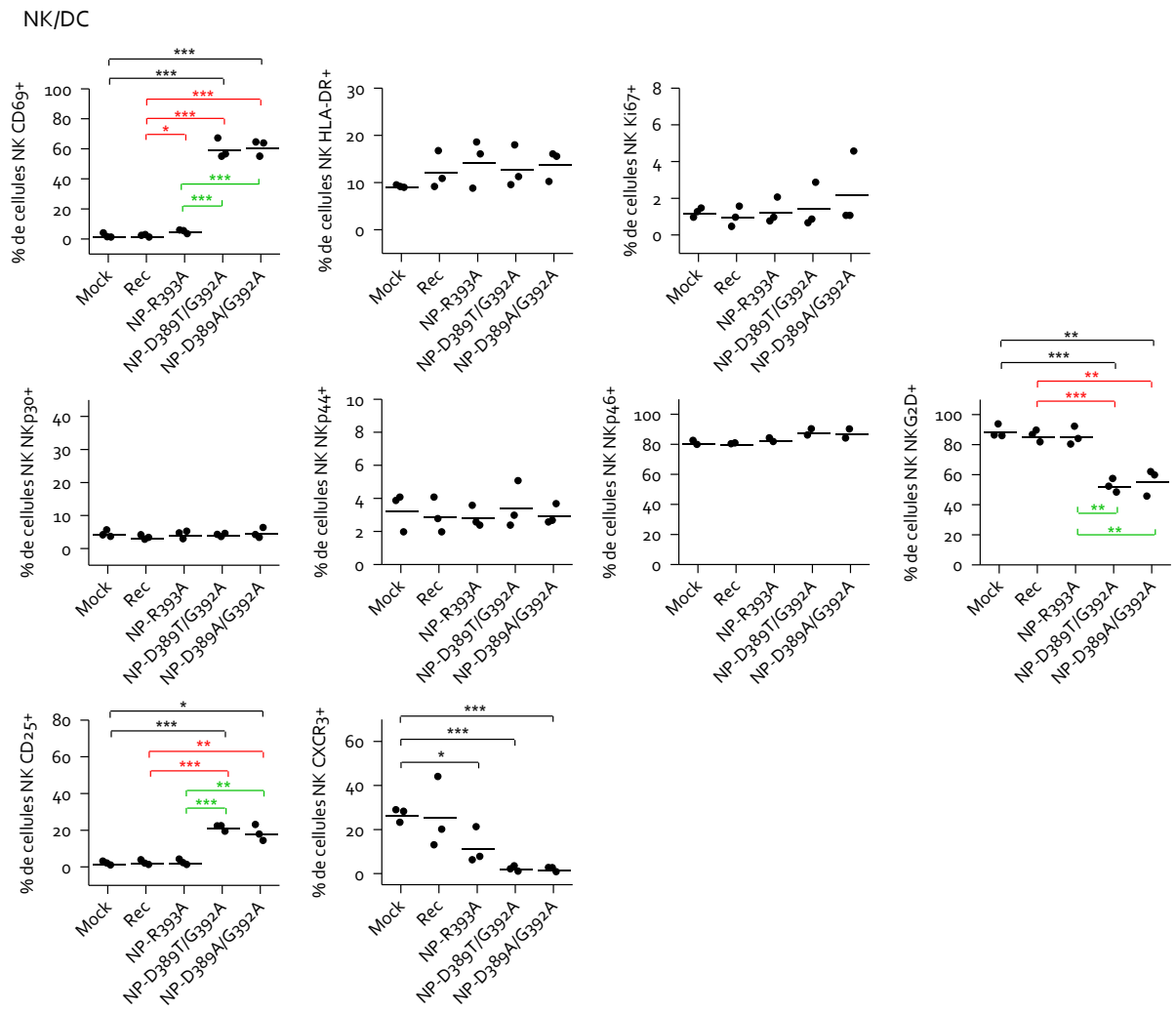
Dans notre modèle, LASV-Rec se comporte comme LASV sauvage. Ainsi, les cellules NK sont activées en présence de macrophages, mais pas en présence de DC, lors de l'infection par LASV-Rec (figure 28).

A l'exception d'une diminution de l'expression de CXCR₃, l'expression des autres molécules détectées n'est pas modifiée par les cellules NK en présence de DC infectées par LASV NP-R393A (figure 28A). En revanche, en présence de macrophages infectés par ce virus mutant, une augmentation significative de l'expression de CD69, HLA-DR, NKp30 et CD25 et une diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK sont observées (figure 28B). L'activation est d'ailleurs significativement supérieure à celle observée en présence de macrophages infectés par LASV-Rec comme en témoigne l'expression de CD69 et CD25. L'expression de Ki67 n'est pas non plus modifiée suggérant que les DC et macrophages infectés par LASV NP-R393A n'induisent pas la prolifération des cellules NK (figure 28A et B).

De façon surprenante, une forte activation des cellules NK en présence de DC infectées par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A a été observée comme en témoigne l'augmentation significative de l'expression de CD69 et CD25 (figure 28A). De plus, une diminution significative de l'expression de NKG2D et de CXCR₃ est notée. Les macrophages infectés par ces virus activent également très fortement les cellules NK (augmentation de l'expression de CD69, HLA-DR et CD25 et diminution des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D ainsi que de CXCR₃) (figure 28B). L'activation des cellules NK est également significativement supérieure à celle observée en présence de CPA infectées par LASV-Rec et par le mutant NP-R393A. L'expression de Ki67 n'est pas modifiée indiquant que les DC et macrophages infectés par les LASV recombinants double mutants n'induisent pas la prolifération des cellules NK (figure 28A et B).

Ainsi, contrairement aux DC infectées par LASV et MOPV, les DC infectées par LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A induisent une forte activation des cellules NK ainsi qu'une absence de prolifération. De plus, l'activation induite par les macrophages infectés par les LASV double mutants est plus intense qu'avec LASV sauvage.

A



B

NK/macrophages

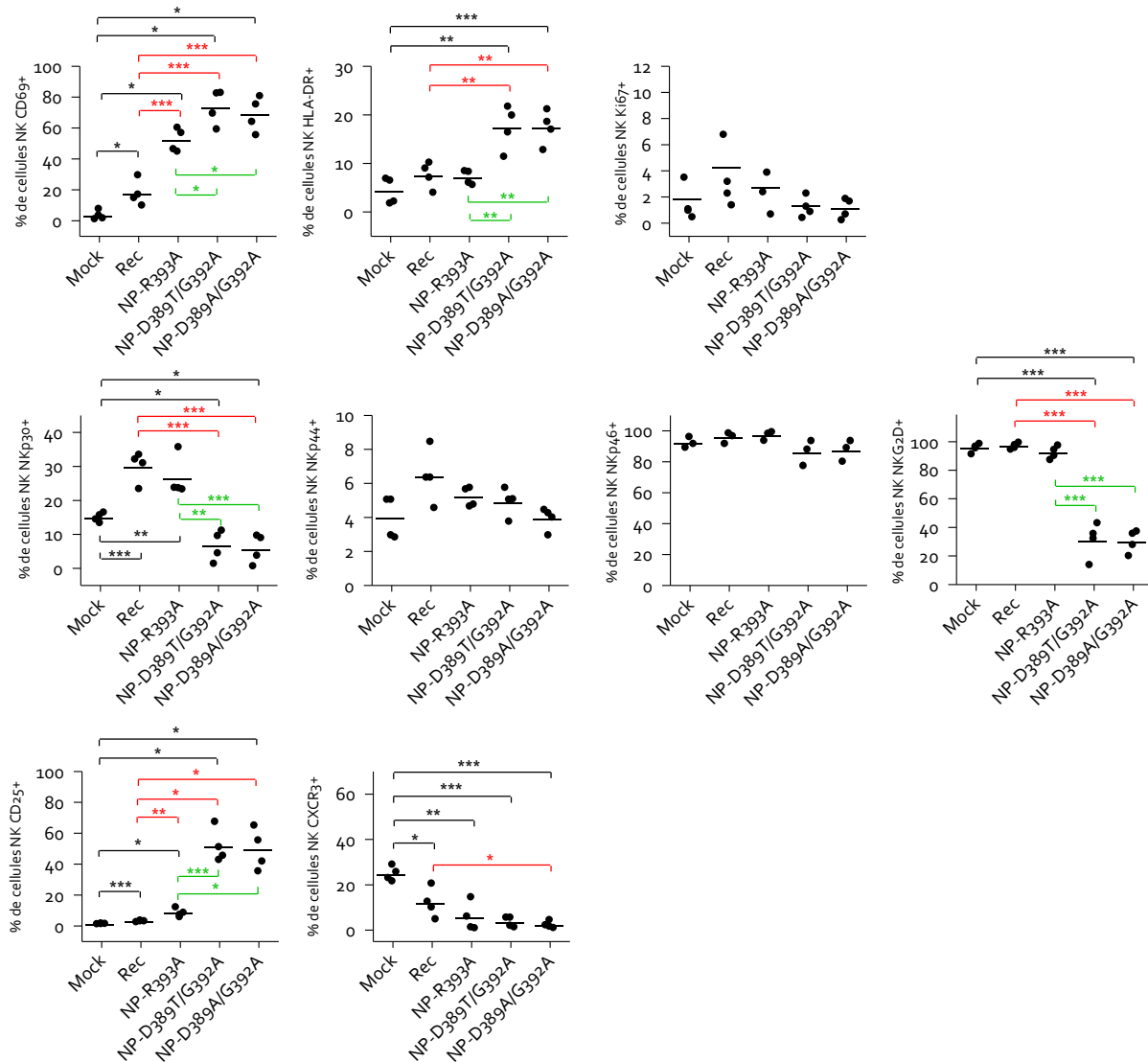


Figure 28. Analyse de l'activation et de la prolifération des cellules NK en présence de DC (A) ou de macrophages (B) infectés ou non (Mock) par les LASV recombinants (Rec, NP-R393A, NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A) (ratio NK/CPA de 1/5). L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD25 et CXCR3 à la surface des cellules NK a été analysée par cytométrie en flux, ainsi que l'expression intracellulaire de Ki67 après 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune figurée par un point. La moyenne des expériences est indiquée par une barre horizontale. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney en comparaison avec les conditions Mock (barres noires), LASV-Rec (barres rouges) ou LASV-NP-R393A (barres vertes): * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.

Fonctions effectrices des cellules NK

⇒ *Production de cytokines*

Dans les cocultures NK/DC et NK/macrophages, nous avons observé une augmentation de la synthèse des ARNm codant TNF- α , TNF- β et IFN- γ lors de l'infection par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A (données non présentées).

Ainsi, il semble que les DC et macrophages infectés par les LASV double mutants puissent induire la production de cytokines par les cellules NK. Cependant, de plus amples investigations sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

⇒ *Cytotoxicité*

Comme en réponse au LASV sauvage et contrairement aux DC, les macrophages infectés par LASV-Rec dans notre modèle de coculture induisent une augmentation de l'expression intracellulaire de GrzB ainsi qu'une augmentation de la dégranulation des cellules NK contre la lignée K562 mais pas contre les cellules infectées (figure 29A et B).

Les macrophages infectés par LASV-R393A, mais pas les DC, stimulent également la lyse des cellules K562 par les cellules NK, et ce malgré l'absence de modulation de l'expression de GrzB et Perforine dans les cellules NK (figure 29A et B).

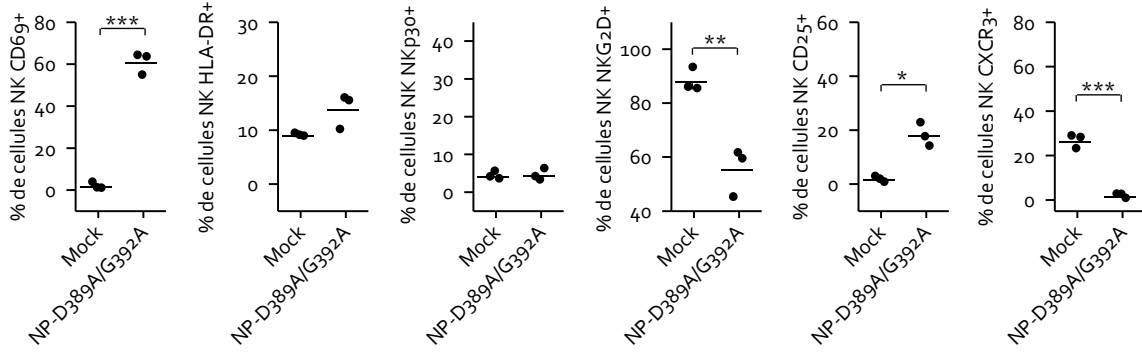
Lors de l'infection par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A, une augmentation de la synthèse des ARNm codant GrzB, Perforine, FasL et TRAIL est observée dans les cocultures NK/macrophages (données non présentées). Les taux intracellulaires de GrzB sont modérément augmentés dans les cellules NK en présence de DC ou macrophages infectés par ces virus, bien que l'analyse statistique ne soit pas significative (figure 29A). Par contre, l'expression de Perforine n'est pas modifiée. Une augmentation significative de la dégranulation des cellules NK en réponse à des cellules K562 est observée en présence de DC et de macrophages lors de l'infection par les LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A comme en témoigne l'expression de CD107a (figure 29B). La dégranulation des cellules NK est également significativement supérieure à celle observée en présence de DC infectées par LASV-Rec et par LASV NP-R393A.

Enfin, nous avons observé une dégranulation significative des cellules NK dans les cocultures NK/DC et NK/macrophages lors de l'infection par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A suggérant que les cellules NK étaient capables de lyser les DC et macrophages infectés (figure 29B).

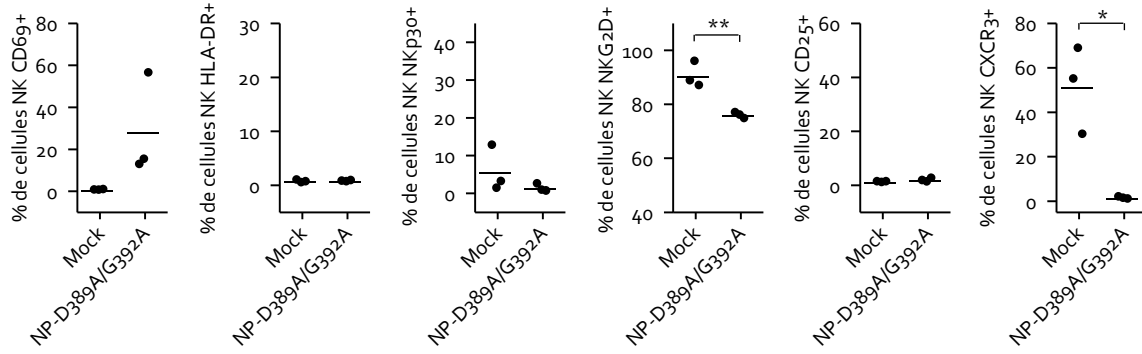
Une réduction de l'activation des cellules NK est observée illustrée par la diminution de l'expression de CD69, CD25 (NK/DC et NK/macrophages) et HLA-DR (NK/macrophages) (figure 30). Cependant, l'expression de NKG2D et CXCR3 (NK/DC et NK/macrophages) et NKp30 (NK/macrophages) à la surface des cellules NK en coculture avec les CPA infectées par LASV NP-D389A/G392A reste diminuée.

Ces expériences démontrent que le contact cellulaire entre les cellules NK et les CPA infectées par LASV NP-D389A/G392A participe à l'activation des cellules NK (expression de CD69, HLA-DR et CD25) mais pas à la modulation des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D.

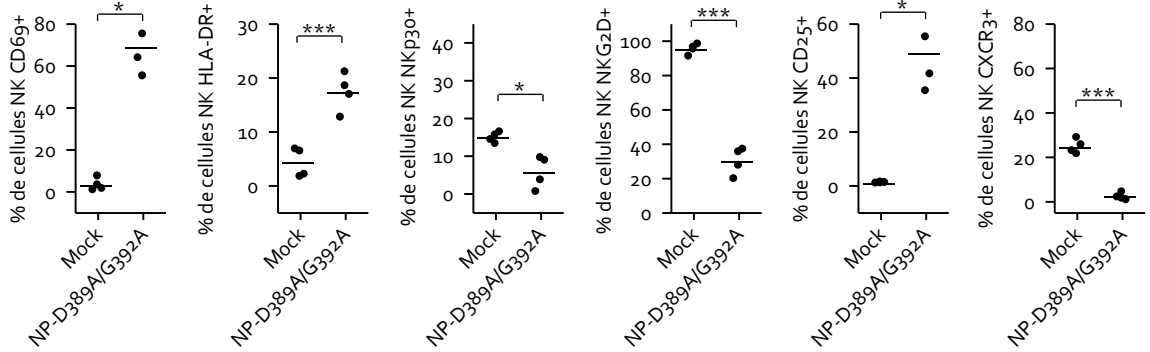
NK/DC



"Transwell" NK/DC



NK/macrophages



"Transwell" NK/macrophages

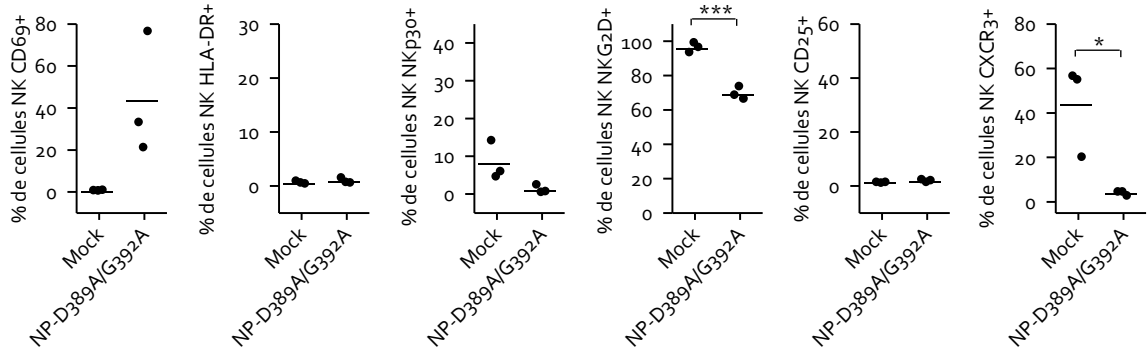


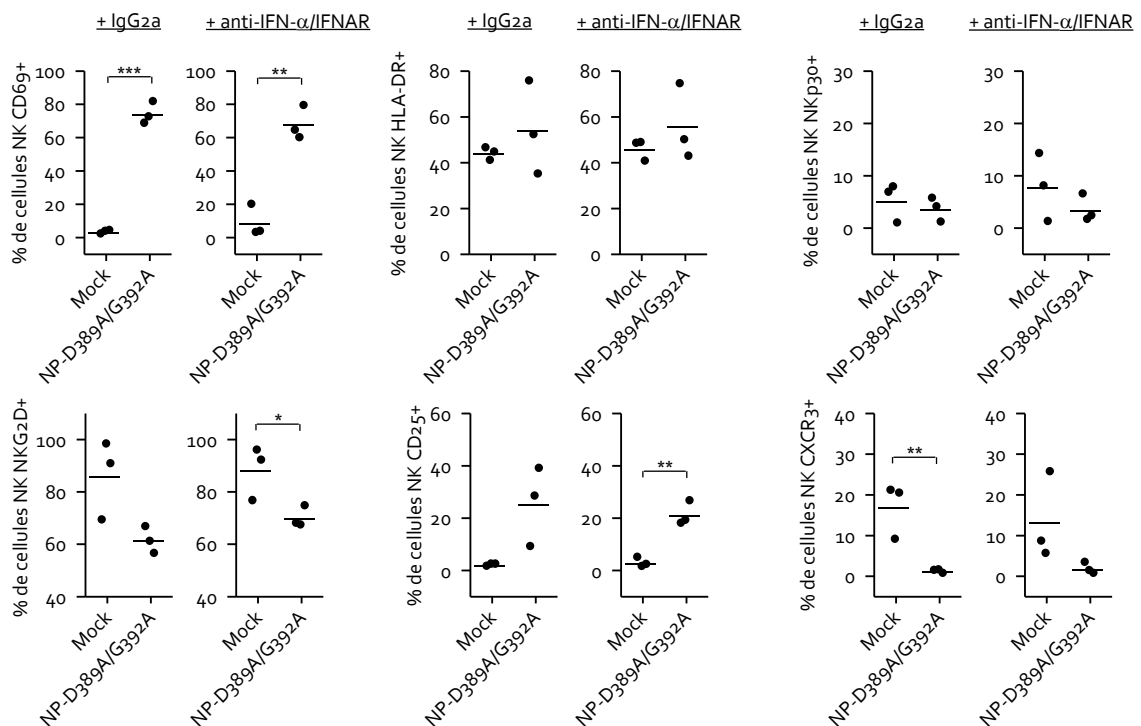
Figure 30. Analyse de l'activation des cellules NK en présence de CPA infectées ou non (Mock) par le LASV recombinant NP-D389A/G392A (ratio NK.CPA de 1/5). Les deux populations cellulaires ont été séparées par une membrane semi-perméable. Les résultats ont été comparés avec ceux décrits précédemment et reporté ici. L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKG2D, CD25 et CXCR3 à la surface des cellules NK a été analysée par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Les graphiques représentent 3 expériences différentes et la moyenne est indiquée par une barre horizontale. Analyse statistique par le test de Student : * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Neutralisation des IFN de type I

Contrairement à ce qui a été observé lors de l'infection par LASV sauvage, l'inhibition de la réponse IFN n'altère pas l'activation des cellules NK induites par les DC ou les macrophages infectés par LASV NP-D389A/G392A comme en témoigne l'expression de CD69, HLA-DR, NKp30, NKG2D, CD25 et CXCR3 (figure 31).

De façon surprenante, les IFN de type I ne semblent pas être impliqués dans l'activation des cellules NK par les CPA lors de l'infection par le LASV double mutant NP-D389A/G392A.

NK/DC



NK/macrophages

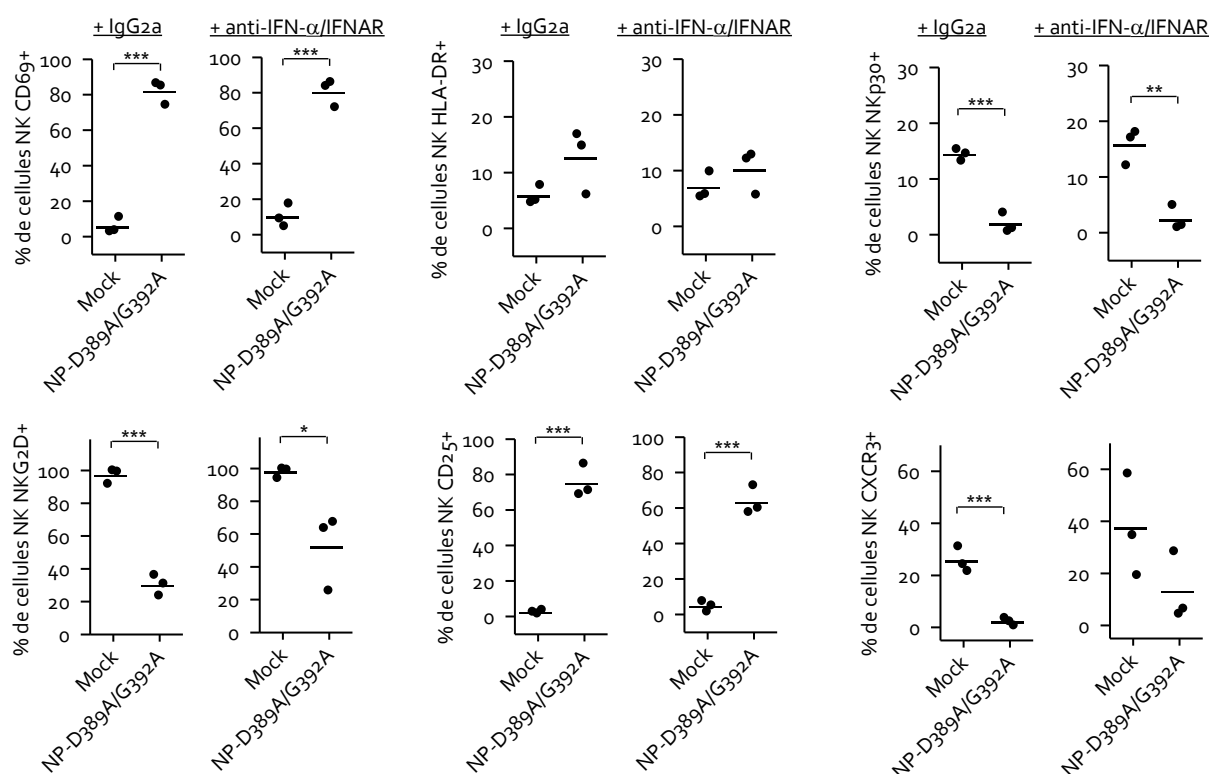


Figure 31. Analyse de l'activation des cellules NK en présence de CPA infectées ou non (Mock) par le LASV recombinant NP-D389A/G392A (ratio NK/CPA de 1/5). Des anticorps neutralisant IFN- α et IFNAR ont été ajoutés dans les cultures pour inhiber la réponse aux IFN de type I. Un anticorps contrôle IgG2a a été utilisé. L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKG2D, CD25 et CXCR3 à la surface des cellules NK a été analysée par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Les graphiques représentent 3 expériences différentes et la moyenne des résultats est indiquée par une barre horizontale. Analyse statistique par le test de Student : * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Nos résultats démontrent que les LASV recombinants double mutants sont capables d'activer fortement les macrophages mais aussi les DC, permettant ensuite d'induire l'activation des cellules NK. Le contact cellulaire avec les CPA est crucial pour l'augmentation de l'expression de CD69 et de CD25 alors que la diminution de NKG2D et de CXCR3 semble plutôt impliquer des facteurs solubles. De façon surprenante, les IFN de type I, produits en très forte quantité en réponse à ces deux virus mutants, ne semblent pas participer à l'activation des cellules NK, au contraire des réponses observées avec LASV sauvage et MOPV.

Activation des cellules NK lors de l'infection par EBOV

Effet d'EBOV sur les cellules NK

⇒ *Activation/prolifération*

En premier lieu, les cellules NK ont été mises en contact d'EBOV ou du virus inactivé par la chaleur et leur statut d'activation a été analysé par cytométrie en flux afin d'évaluer une éventuelle action directe du virus sur ces cellules (figure 32).

Des travaux ont montré qu'EBOV ne se répliquaient pas dans les populations lymphocytaires [423, 440]. Nous n'avons pas observé d'activation ou de prolifération des cellules NK en présence d'EBOV au regard de l'expression de CD69, HLA-DR, CD25 ou Ki67. Une diminution de l'expression de NKp30 et une augmentation modérée de l'expression de CXCR3 ont été observées en présence d'EBOV mais n'étaient pas significatives. L'expression des autres récepteurs activateurs NKp44, NKp46 et NKG2D ainsi que de la molécule d'adhésion CD62L est restée cependant inchangée.

En revanche, la modulation de l'expression de NKp30 et CXCR3 est significativement augmentée en présence d'EBOV inactivé.

⇒ *Productions de cytokines*

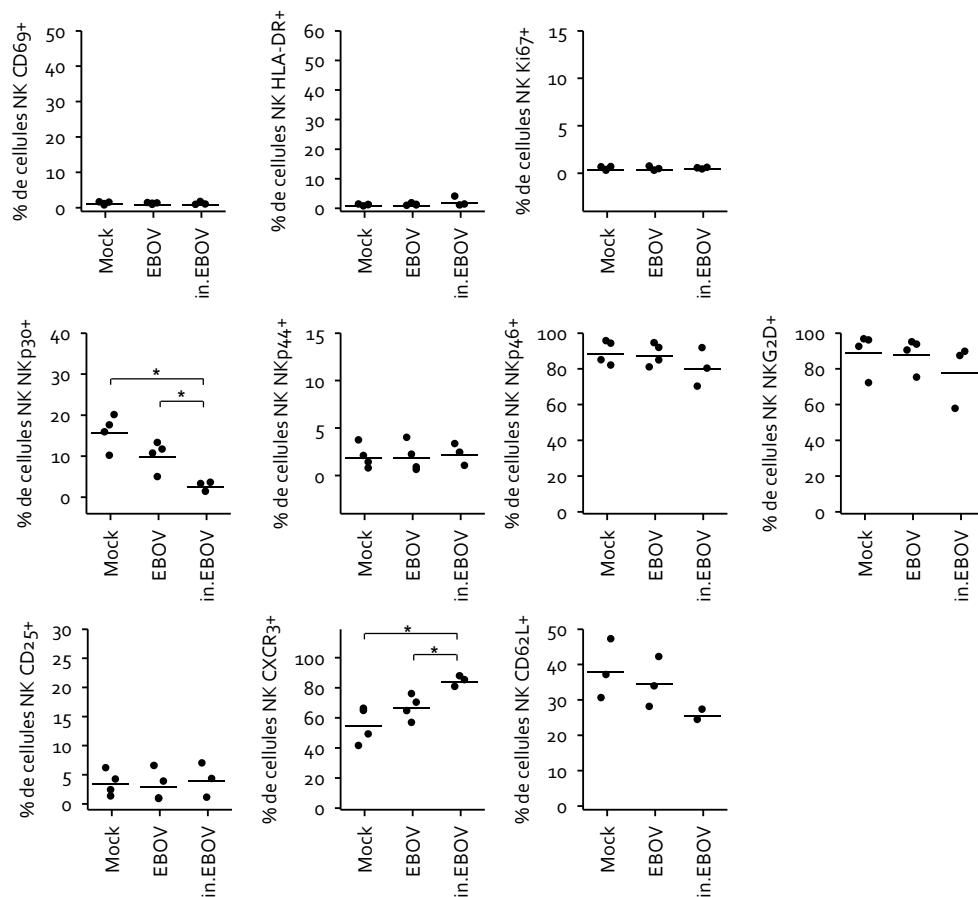
La synthèse des gènes codant TNF- α , TNF- β ou IFN- γ n'est pas modulée au contact d'EBOV alors qu'elle augmente lors de l'ajout de PMA/ionomycine (figure 32B).

⇒ *Cytotoxicité*

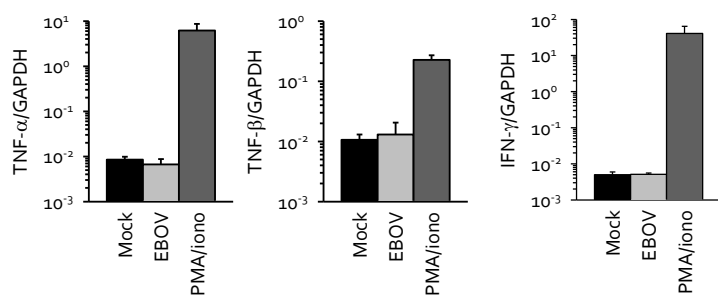
Nous avons également observé qu'EBOV n'induit pas la transcription de GrzB ou FasL par les cellules NK. Au niveau protéique, l'expression intracellulaire de GrzB et Perforine n'est pas modifiée au contact d'EBOV. Enfin, les cellules NK ne lysent pas les autres cellules NK, ni les cellules cibles K562 en réponse au virus (figure 32C, D, E).

En présence d'EBOV inactivé, l'expression intracellulaire de GrzB par les cellules NK est par contre significativement diminuée (figure 32C, D, E).

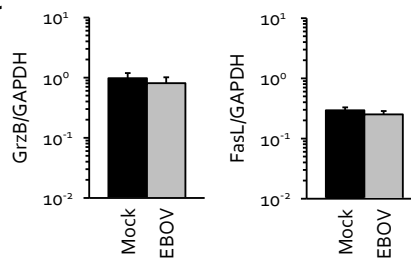
A



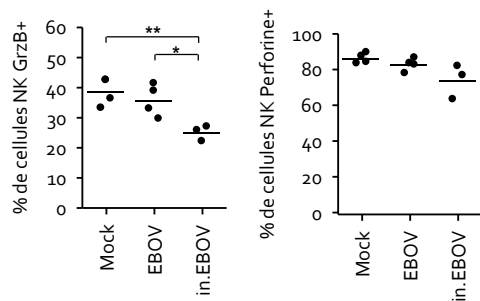
B



C



D



E

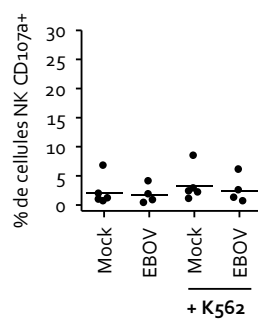


Figure 32. Analyse de l'activation, de la prolifération (A), de la production de cytokines (B) et des capacités cytotoxiques (C, D et E) des cellules NK au contact d'EBOV virulent et EBOV inactivé. A. L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD25, CXCR3 et CD62L à la surface des cellules NK et l'expression intracellulaire de Ki67 ont été analysées par cytométrie en flux après 3 jours de culture. Les graphiques représentent différentes expériences, chacune figurée par un point. La moyenne des résultats est indiquée par une barre horizontale. B, C. Analyse de la transcription des gènes TNF- α , TNF- β et IFN- γ (B) et GrzB et FasL (C) par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Une combinaison PMA/ionomycine a été ajoutée dans les cultures dans certaines conditions. Les graphiques représentent la moyenne de 5 expériences et l'erreur standard. D. Analyse de l'expression de GrzB et Perforine par cytométrie en flux intracellulaire après 3 jours de culture. E. Analyse de la dégranulation des cellules NK (expression à la surface de CD107a) après 2 jours de culture. Des cellules cibles K562 ont été ajoutées dans certaines conditions. Analyse statistique par les tests de Student ou de Mann-Whitney : * : $p \leq 0.05$, ** : $p \leq 0.01$, *** : $p \leq 0.001$.

Ces premiers résultats montrent que les cellules NK ne sont pas activées et ne prolifèrent pas au contact d'EBOV. La production de cytokines ou leur potentiel cytotoxique n'est pas non plus modulé. EBOV inactivé est cependant capable d'induire la modulation de l'expression de NKp30, de CXCR3 et de GrzB.

Coculture NK/CPA lors de l'infection par EBOV

- **Activation des CPA**

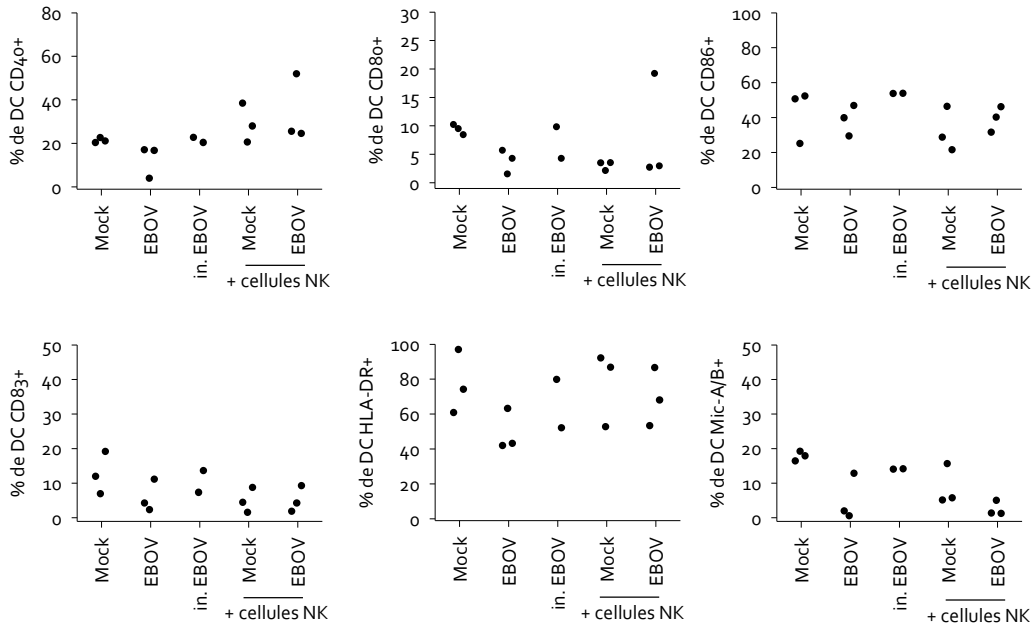
Le statut d'activation des CPA infectées par EBOV a été étudié dans notre modèle de coculture NK/CPA et a été comparé à celui observé dans les cultures de CPA seules.

⇒ *Expression des molécules de surface*

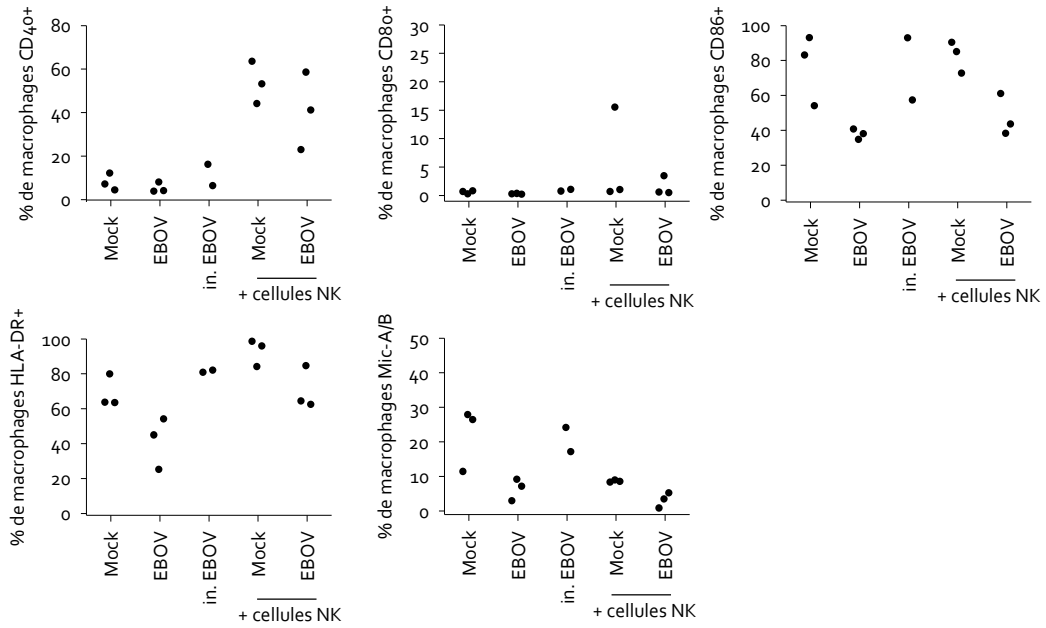
Malgré le petit nombre d'expériences réalisées, l'infection des DC par EBOV semble induire une diminution de l'expression de CD80 et HLA-DR (DC) et Mic-A/B (DC et NK/DC) et l'infection des macrophages semble induire une diminution de l'expression de CD86, HLA-DR et Mic-A/B (macrophages et NK/macrophages). Ces observations suggèrent que les DC et les macrophages infectés par EBOV ne sont pas activés en présence ou non de cellules NK (figure 33A).

A

DC et NK/DC



macrophages et NK/macrophages



B

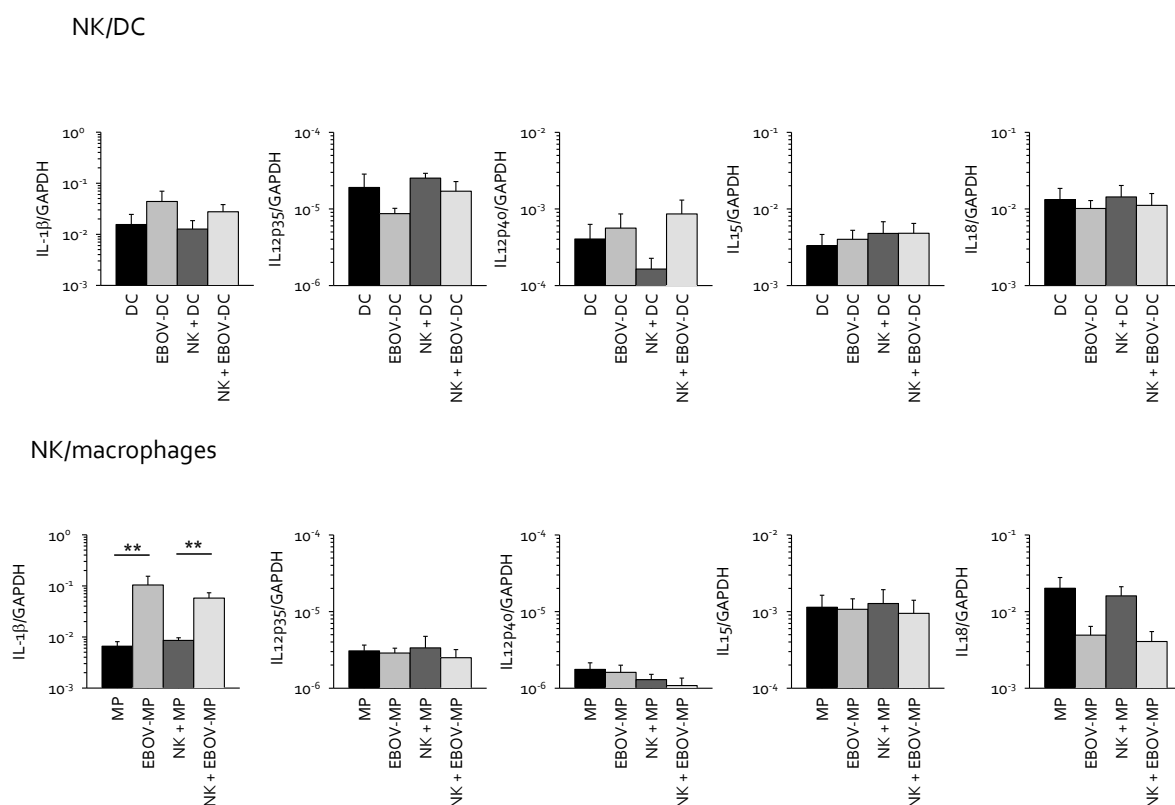


Figure 33. Analyse de l'activation (A) des CPA infectées ou non (Mock) par EBOV et de la production de cytokines (B), en présence ou non de cellules NK. A. L'expression des molécules CD40, CD80, CD86, CD83, HLA-DR et Mic-A/B à la surface des DC et des macrophages a été analysée par cytométrie en flux après 2 ou 3 jours de culture. Les graphiques représentent différentes expériences, chacune figurée par un point. B. Analyse de la transcription des gènes IL-1 β , IL-12p35, IL-12p40, IL-15, et IL-18 par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Les graphiques représentent la moyenne de 5 expériences et l'erreur standard. Analyse statistique par le test de Mann-Whitney : ** : $p < 0,01$.

⇒ Production de cytokines

Nous avons analysé la production de cytokines produites par les CPA en réponse à EBOV dans les cultures de CPA seules et dans les cocultures NK/DC et NK/macrophages (figure 33B). Il semble que l'infection des DC par EBOV induise la transcription d'IL-1 β (DC et NK/DC) et d'IL12-p40 (NK/DC), cependant ces résultats ne sont pas significatifs en raison du petit nombre d'expériences réalisées. La synthèse d'IL-1 β augmente significativement dans les cultures de macrophages seuls et dans les cocultures NK/macrophages et il semble également que la transcription d'IL-18 soit réduite. La présence de cellules NK ne semble pas influencer sur la production de cytokines par les CPA. Enfin, les gènes des IFN de type I (IFN- β , IFN- α 1 et IFN- α 2) ne sont pas transcrits lors de l'infection des CPA par EBOV (données non présentées).

Ces résultats suggèrent que les DC et les macrophages ne sont pas activés lors de l'infection par EBOV comme en témoigne l'expression des molécules impliquées dans la costimulation et la présentation de l'antigène, et de la production de cytokines.

- *Activation des cellules NK*

⇒ *Activation/Prolifération des cellules NK*

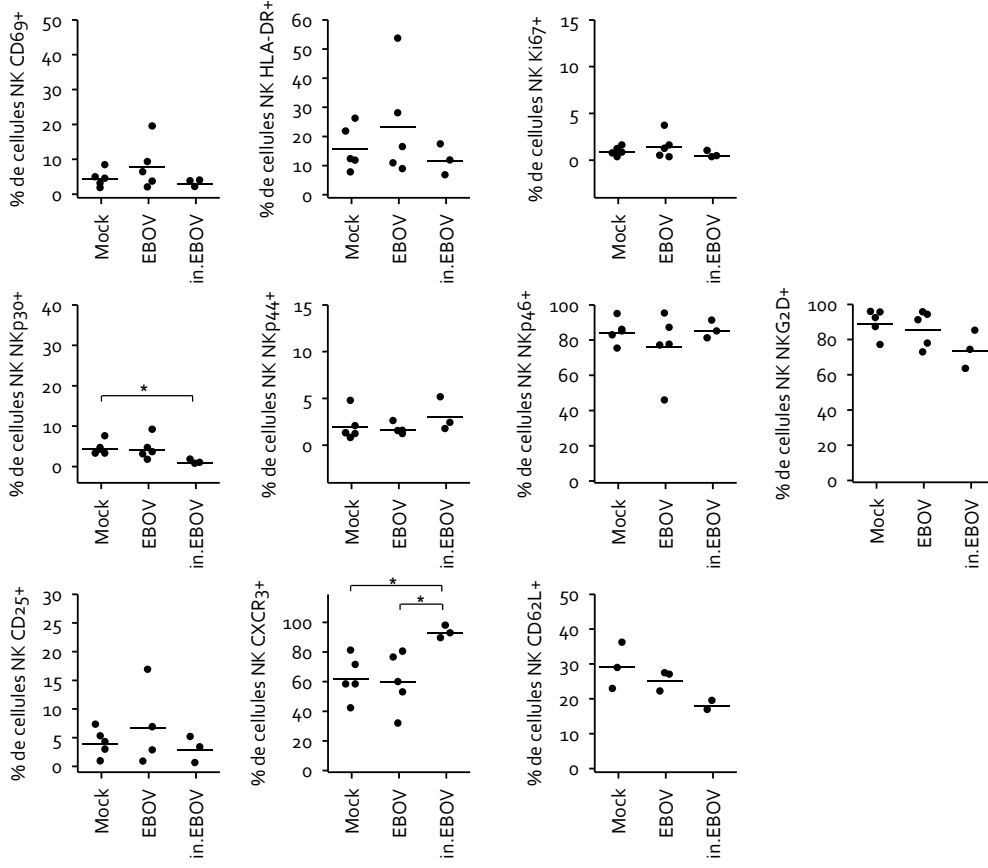
Le statut d'activation des cellules NK cultivées avec des DC ou macrophages infectés par EBOV virulent et EBOV inactivé a été analysé (figure 34).

Comme lors de l'analyse des cultures de cellules NK sans CPA, l'expression de CD69, HLA-DR, CD25, des récepteurs activateurs NKp30, NKp44, NKp46 et NKG2D ainsi que des autres molécules CXCR3 ou CD62L n'est pas modifiée à la surface des cellules NK dans les cocultures NK/CPA lors de l'infection par EBOV. Dans les cocultures NK/macrophages, l'activation des cellules NK augmente faiblement lors de l'infection par EBOV au regard de l'expression de CD69. L'expression des autres molécules HLA-DR, CD25, CXCR3, CD62L n'est pas modifiée et parmi les récepteurs activateurs analysés, seule l'expression de NKp30 diminue en présence de macrophages infectés par EBOV. Dans les cocultures NK/DC et NK/macrophages, nous n'observons pas de prolifération des cellules NK comme en témoigne l'expression de Ki67.

De plus, comme lors de l'analyse des cultures de cellules NK sans CPA, une diminution de l'expression de NKp30 et une augmentation de l'expression de CXCR3 en présence de DC ou macrophages infectés par EBOV inactivé sont observées. En revanche, l'expression de CD69 reste inchangée en présence de macrophages en réponse à EBOV inactivé.

Nos résultats démontrent que les cellules NK ne sont pas ou peu activées et ne prolifèrent pas en réponse aux DC et macrophages infectés par EBOV. L'infection productive des macrophages est nécessaire à l'augmentation de l'expression de CD69 à la surface des cellules NK. De plus, l'infection des CPA par EBOV inactivé induit la modulation de l'expression de NKp30 et CXCR3 à la surface des cellules NK comme dans les cultures de NK seules.

NK/DC



NK/macrophages

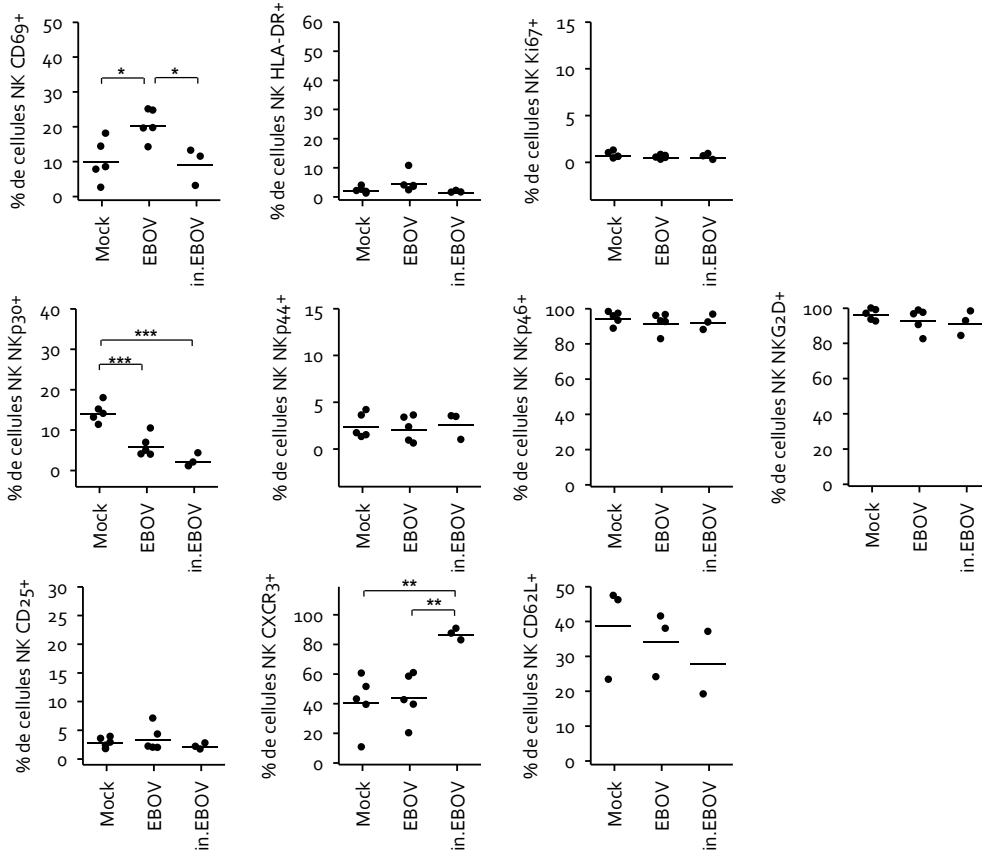


Figure 34. Analyse de l'activation et de la prolifération des cellules NK en présence de DC ou macrophages infectés ou non (Mock) par EBOV virulent et EBOV inactivé (ratio NK/CPA de 1/5). L'expression des molécules CD69, HLA-DR, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, CD25, CXCR3 et CD62L à la surface des cellules NK a été analysée par cytométrie en flux, ainsi que l'expression intracellulaire de Ki67 après 2 ou 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes, chacune est représentée par un point. Les moyennes des résultats sont indiquées par une barre horizontale. Analyse statistique par les tests de Student pu de Mann-Whitney : * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$.

⇒ Production de cytokines

La synthèse des gènes codant le TNF- α , le TNF- β ou l'IFN- γ n'est pas modulée dans les cocultures NK/DC ou NK/macrophages lors de l'infection par EBOV (figure 35). De même, les cytokines TNF- α et IFN- γ ne sont pas été détectées par ELISA dans les surnageants de cultures lors de l'infection par EBOV (données non présentées).

Ainsi, les CPA infectées par EBOV ne sont pas en mesure d'induire la production de cytokines par les cellules NK.

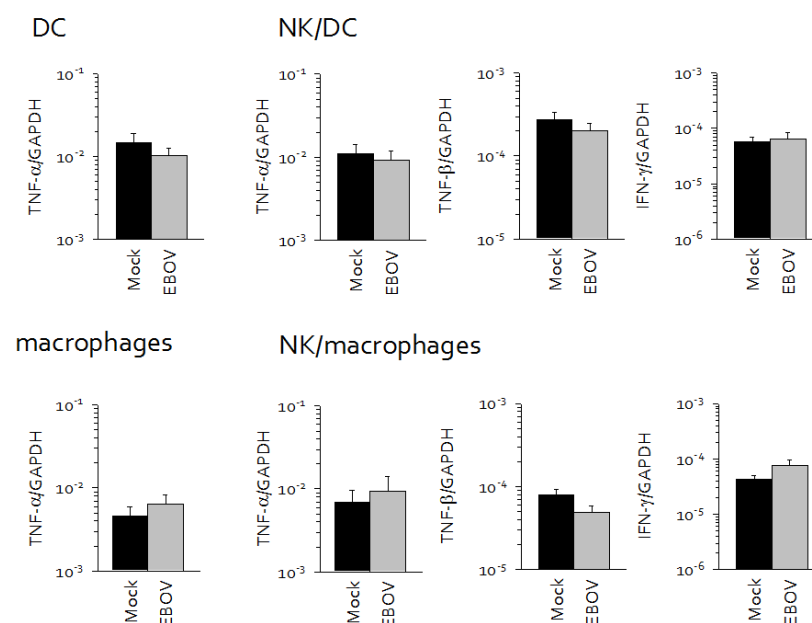


Figure 35. Analyse de la production de cytokines par les cellules NK cocultivées avec des DC ou macrophages infectés par EBOV ou non (Mock). Analyse de la transcription des gènes TNF- α (CPA seules et NK/CPA), TNF- β et IFN- γ (NK/CPA) par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Les graphiques représentent la moyenne de 5 expériences et l'erreur standard.

⇒ Fonctions cytotoxiques

Les CPA infectées par EBOV n'induisent pas la transcription de GrzB ou FasL par les cellules NK (figure 36A). Au niveau protéique, l'expression intracellulaire de GrzB et Perforine n'est pas modifiée au contact d'EBOV (figure 36B). En revanche, en présence de DC ou macrophages et du virus inactivé, l'expression intracellulaire de GrzB par les cellules NK diminue significativement. Enfin, dans les cocultures NK/CPA, les cellules NK ne lysent pas les autres cellules NK ni les cellules cibles K562 (figure 36D).

Enfin, le potentiel cytotoxique des cellules NK n'est pas augmenté en présence de DC ou de macrophages infectés par EBOV. L'expression de GrzB diminue toutefois dans les cocultures NK/CPA en réponse à EBOV inactivé.

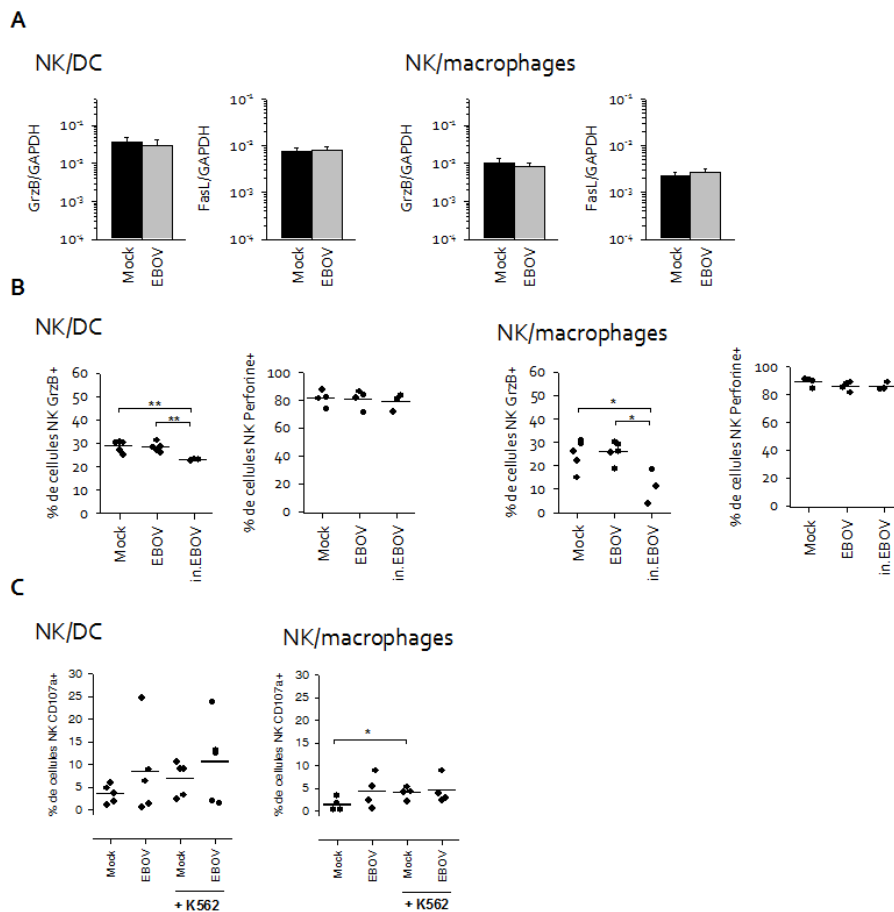


Figure 36. Capacités cytotoxiques des cellules NK en coculture avec des DC ou des macrophages infectés ou non (Mock) par EBOV (ratio NK/CPA de 1/5). **A.** Analyse de la transcription des gènes GrzB et FasL par RT-PCR en temps réel après 24h de culture. Les graphiques représentent la moyenne de 5 expériences et l'erreur standard. **B.** Analyse de l'expression de GrzB et de Perforine par cytométrie en flux intracellulaire après 3 jours de culture. Les graphiques représentent plusieurs expériences différentes et chacune est figurée par un point. La moyenne des résultats est indiquée par une barre horizontale. **C.** Analyse de la dégranulation des cellules NK (expression à la surface de CD107a) après 2 jours de culture. Des cellules cibles K562 ont été ajoutées dans certaines conditions. Analyse statistique par les tests de Student ou Mann-Whitney: * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$.

Discussion

Le modèle de coculture NK/CPA

Les mécanismes de la réponse immunitaire et de la pathogenèse développés lors de la fièvre de Lassa sont peu connus. Le PNH constitue le modèle animal le plus pertinent pour étudier les mécanismes de la physiopathogenèse et les réponses immunes au cours des fièvres hémorragiques à LASV et EBOV. Cependant, l'utilisation de ces animaux pose des problèmes éthiques. De plus, la nécessité de manipuler ces virus en laboratoire P₄ rend l'utilisation de ces animaux compliquée et très onéreuse. Notre laboratoire a développé plusieurs modèles *in vitro* permettant d'étudier les réponses immunitaires induites lors de l'infection par LASV chez l'homme [75, 257]. L'activation des cellules NK est impliquée dans le contrôle de certaines infections virales par l'intermédiaire de la production de cytokines et de la lyse des cellules infectées [410]. Chez l'homme, leur rôle dans la majorité des infections virales est toutefois controversé. En effet, les individus incapables de développer des réponses NK fonctionnelles ne sont pas particulièrement sensibles aux infections virales et les cellules NK ne jouent qu'un rôle minoritaire lors de l'infection par LCMV, un Arénavirus proche de LASV [381, 432]. L'efficacité de la réponse immunitaire réside cependant dans la redondance des réponses mises en jeu. Les interactions entre les cellules NK et les CPA conduisent à l'activation des fonctions effectrices des cellules NK et à l'activation des CPA et donc à l'augmentation des réponses immunitaires. De nombreux travaux ont été réalisés dans le but d'étudier les interactions entre les cellules NK et les DC lors des infections par des pathogènes [420, 424, 426, 428, 431]. En revanche, les interactions entre les cellules NK et les macrophages ont été, à ce jour, peu étudiées. Il a été montré que lors de l'infection par le *Plasmodium falciparum*, les interactions entre les cellules NK et les macrophages conduisent à la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK par l'intermédiaire d'IL-18 sécrétée par les macrophages [404, 425]. Les macrophages infectés par *Salmonella* induisent également l'activation des cellules NK, la production d'IFN- γ et le contrôle de la multiplication de ces bactéries dans le cytoplasme des macrophages [427]. Les cellules NK sont également activées et produisent de l'IFN- γ lors du contact cellulaire avec des macrophages infectés par le virus de la grippe A ou le virus Sendai [429]. Le rôle des cellules NK lors de l'infection par LASV et EBOV et les conséquences des interactions entre les cellules NK et les DC et macrophages, cellules cibles du virus, sur le développement des réponses immunes et la pathogenèse n'est pas connu. Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé un modèle *in vitro* de coculture de cellules NK avec des CPA infectées afin d'étudier le rôle des cellules NK et l'importance des interactions NK/CPA au cours des fièvres hémorragiques à LASV et EBOV. Les DC et macrophages ont été différenciés à partir des monocytes du sang par un cocktail de cytokines [75, 218]. Elles ont ensuite été infectées par les virus ou stimulées puis cocultivées avec des cellules NK autologues, isolées également du sang.

L'activation des cellules NK était supérieure dans les cocultures NK/DC et NK/macrophages par rapport à celle observée dans les cultures de cellules NK seules. Ces données démontrent que les DC et macrophages non infectés sont bien en mesure d'activer les cellules NK comme il est classiquement connu. Cette activation reste toutefois faible d'une part, car les DC sont immatures et ne sont pas capables d'induire une très forte activation des cellules NK et d'autre part, probablement en raison des conditions de culture choisies (ratio NK/CPA, absence de cytokines additionnelles comme l'IL-2 ou l'IL-15 même en concentration suboptimale).

Nous avons utilisé le LPS pour activer les CPA et analyser l'activation des cellules NK médiée par les CPA activées. Dans notre modèle, les cellules NK acquièrent un phénotype d'activation illustré par la modulation de l'expression de CD69, NKp30, NKp44, NKG2D et CXCR3, de la production d'IFN- γ et de l'augmentation du potentiel cytotoxique en présence de CPA stimulées par le LPS. Le LPS est un composant de la paroi des bactéries gram (-) qui induit la maturation/activation des CPA par le biais du récepteur TLR4/CD14 [441]. Ce stimulus est différent des PAMP viraux, et le Poly (I:C), un analogue synthétique de l'ARN double brin reconnu par le TLR3, aurait pu être utilisé pour induire l'activation des CPA avec un stimulus plus proche de nos virus. Cependant, les cellules NK expriment le TLR3 et sont sensibles au Poly (I:C) [391]. En revanche, nous avons vérifié que le LPS n'activait pas les cellules NK (données non présentées). Nous avons ainsi choisi le LPS pour activer spécifiquement les CPA et induire l'activation des cellules NK médiée par les CPA. L'utilisation de ce contrôle a, de plus, permis de valider la fonctionnalité des DC et macrophages et des interactions NK/CPA dans notre modèle. Nos résultats concernant l'activation des cellules NK par les CPA stimulées par le LPS sont en accord avec les études précédentes. En effet, le LPS classiquement induit l'activation des DC et des macrophages entraînant en retour l'activation, la modification du répertoire des récepteurs, la production d'IFN- γ et la cytotoxicité des cellules NK [219, 442]. Comme décrit précédemment [404], les macrophages stimulés par du LPS induisent par exemple la diminution de l'expression du récepteur NKG2D dans notre modèle.

Afin de disposer d'un contrôle positif d'activation des cellules NK, nous avons utilisé l'IL-2/PHA qui induit l'activation, la sécrétion d'IFN- γ et l'augmentation du potentiel cytotoxique des cellules NK dans notre modèle. D'autres inducteurs de la synthèse de cytokines tels que les combinaisons PMA/ionomycine ou IL-12/IL-18 ont été également utilisés afin de confirmer la capacité des cellules NK à produire des cytokines. En effet, comme l'IL-2, la stimulation de cellules NK par la combinaison PMA/ionomycine induit l'expression des gènes IFN- γ et TNF- α [443]. De plus, il a été montré que la coopération des cytokines IL-12 et IL-18 entraîne la production d'IFN- γ [396]. Dans notre modèle, les cellules NK étaient capables de produire des cytokines en présence d'IL-2/PHA, PMA/ionomycine ou d'IL-12/IL-18.

Lors des études *in vitro*, il a été montré que les cellules NK induisent des réponses différentes selon le ratio entre les cellules NK et les DC [408]. Un ratio NK/DC proche de 5/1 conduit à la lyse des DC immatures par les cellules NK tandis qu'un ratio proche de 1/5 entraîne la production de cytokines par les DC. Nous avons choisi un ratio NK/CPA permettant de détecter une activation optimale des cellules NK. En accord avec d'autres travaux [420], la meilleure activation des cellules NK a été observée à un ratio NK/DC de 1/5. En revanche, un ratio de 5/1 a été utilisé afin d'évaluer l'influence des cellules NK sur la réplication virale et la lyse des cellules infectées lors des expériences de titrage des surnageants de coculture NK/CPA.

Les CPA ont été infectées puis les cellules NK ont été mises en contact avec ces cellules le même jour. Le pic de réplication virale intervient entre un et deux jours après l'infection dans ces cellules [75, 217]. Ainsi, afin de permettre la détection d'une activation optimale, différents temps après l'infection ont été comparés. L'expression des gènes était similaire un ou deux jours après l'infection virale et la mise en culture. L'activation des cellules NK évaluée par cytométrie en flux était maximale après deux ou trois de coculture avec les CPA infectées. Nous avons finalement choisi d'analyser la modulation de l'expression des molécules reflétant l'activation, la prolifération et des récepteurs du répertoire des cellules NK trois jours après l'infection. La capacité cytolytique des cellules NK contre la lignée K562 a été évaluée après deux jours de coculture avec les CPA. L'analyse par cytométrie en flux de la présence d'IFN- γ dans les cellules NK en coculture avec les CPA infectées a donné les mêmes résultats 4h, un jour et deux jours après l'infection (données non présentées). Dans les contrôles positifs, les cellules NK ont été stimulées avec des combinaisons PMA/ionomycine ou IL-12/IL-18 classiquement 4h et 20h respectivement, avant l'analyse.

Les cellules NK ne sont pas infectables ni activées en réponse à LASV et MOPV

Nous avons d'abord analysé la susceptibilité des cellules NK à l'infection par LASV et MOPV. Aucune particule virale n'a été détectée à l'intérieur du cytoplasme des cellules NK par immunofluorescence et analyse microscopique. L'absence de particules virales dans les surnageants de cellules NK a montré que les virus ne se répliquaient pas. LASV et MOPV ne semblent donc pas infecter les cellules NK. Ce résultat était attendu et concordant avec les études antérieures. En effet, il a été montré que le récepteur d'entrée de LASV et MOPV α -DG s'exprime préférentiellement à la surface des DC et peu sur les lymphocytes [444, 445]. De plus, lors de l'infection par LCMV, un autre Arénavirus proche de LASV et MOPV, moins de 1% des lymphocytes T et B sont infectés *in vivo* chez la souris [445]. Ces données indiquent que les cellules NK ne sont pas des cellules cibles de LCMV, LASV et MOPV.

Les cellules NK expriment des PRR et sont capables de détecter les PAMP des virus. L'engagement des PRR entraîne une cascade de signalisation conduisant à l'activation des cellules et à la sécrétion d'IFN de type I. Afin de déterminer l'action directe de LASV et MOPV sur les cellules NK, le statut d'activation de ces cellules a été analysé. Lors du contact avec les virus, les cellules NK ne sont pas activées. Les virus n'induisent pas la production de cytokines et n'augmentent pas le potentiel cytotoxique de ces cellules. Ce résultat était attendu puisqu'il est admis que l'activation des cellules NK nécessite une coopération de signaux donnés par l'engagement des PRR mais aussi des cellules accessoires par l'intermédiaire des récepteurs activateurs et des cytokines sécrétées. En effet, la stimulation des TLR3 et TLR7/8 induit l'activation des cellules NK illustré par l'augmentation de l'expression de CD69 mais la sécrétion d'IFN- γ et l'induction de la cytotoxicité nécessite la coopération des monocytes par l'intermédiaire de l'IL-12, IL-15 ou IFN- α et de l'engagement du récepteur NKG2D [390, 391].

Toutefois, une diminution modérée de l'expression de NKp30 et une augmentation de l'expression de CXCR3 a été observée à la surface des cellules NK en présence de LASV ou MOPV. La diminution de l'expression de NKp30 pourrait être liée à la liaison de ce récepteur avec la GP de LASV ou MOPV. Certaines protéines virales ont été impliquées dans l'interaction avec NKp30 telle que la protéine pp65 du cytomégalo virus humain [371]. Cette liaison conduit à l'inactivation du récepteur et à l'inhibition des fonctions des cellules NK. Cependant, aucune étude à ce jour ne permet d'affirmer la liaison de LASV et MOPV avec les récepteurs des cellules NK. Par ailleurs, nos résultats suggèrent également que les cellules NK pourraient détecter LASV et MOPV par l'engagement de TLR7 par les ARN viraux. D'autres études ont montré que le TLR7 est exprimé par les cellules NK et

est fonctionnel [390, 391]. Cependant, aucune donnée n'a mis en évidence de lien entre la stimulation du TLR7 et la modulation du répertoire des cellules NK et en particulier, la modification de l'expression des molécules NKp30 et CXCR3. D'autres investigations sont donc requises pour préciser ces observations. Cependant, l'implication de TLR7 dans le développement des réponses immunitaires adaptatives lors de l'infection par LCMV chez la souris a été récemment démontrée [446]. Enfin, d'après nos résultats, les TLR3 et TLR8 ne semblent pas être impliqués dans la modulation de l'expression de NKp30 et CXCR3 dans les cultures de cellules NK seules. D'autres PRR pourraient également être impliqués dans la modulation de l'expression de NKp30 et CXCR3. Il a ainsi été récemment suggéré que les Arénavirus pourraient être reconnus par le TLR2 [225, 226] mais aussi par l'hélicase RIG-I [227]. Ces hypothèses nécessitent d'autres investigations. De plus, le rôle de TLR2 ou RIG-I dans la modulation de l'expression de NKp30 et CXCR3 n'est pas connu.

Les cellules NK ne s'activent pas en présence de DC infectées par LASV et MOPV

Le dialogue qui a lieu lors des interactions entre les cellules NK et les CPA comme les DC permet d'augmenter les réponses des cellules NK. Afin de déterminer l'importance de ces interactions lors de l'infection par LASV et MOPV, nous avons analysé le statut d'activation des cellules NK et leurs fonctions effectrices en présence de DC infectées.

Les molécules CD69, HLA-DR, CD25 et le récepteur activateur NKp44 sont exprimés uniquement à la surface des cellules NK activées. Nos résultats ont montré que l'expression de ces molécules à la surface des cellules NK n'est pas modifiée en réponse à des DC infectées par LASV ou MOPV. Les DC infectées par LASV et MOPV n'induisent pas non plus la modification du répertoire des récepteurs activateurs et inhibiteurs, ni la prolifération des cellules NK, la production de cytokines et l'augmentation de leur potentiel cytotoxique. L'absence de réponse des cellules NK en présence de DC infectées par LASV et MOPV est probablement due à l'absence d'activation des DC lors de l'infection par ces deux virus. En effet, les expériences de cultures de DC seules ou en présence de cellules NK ont montré que l'infection par LASV ou MOPV n'induit pas l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation à la surface des DC [75, 217]. Ces cellules ne produisent pas d'IFN de type I lors de l'infection par LASV et seuls de faibles taux d'ARNm codant les IFN de type I sont détectés dans les DC infectées par MOPV [217, 238]. De plus, les résultats obtenus avec les DC activées par le LPS confirment que les DC activées sont capables de stimuler les cellules NK.

Nous avons également étudié le rôle des cellules NK sur l'activation des DC dans notre modèle *in vitro*. Il a été observé que la présence de cellules NK n'augmente pas la production de IFN de type I, ni n'active la production d'IL-12, IL-15 et IL-18 par les DC. Les cellules NK ne semblent donc pas jouer un rôle sur l'activation des DC. Les DC infectées par LASV et MOPV expriment les molécules du CMH-I, permettant la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques. À ce jour, le contrôle de l'infection par LASV semble être probablement lié au développement d'une immunité cellulaire T et à la réponse des lymphocytes T cytotoxiques [102, 257]. En effet, dans un modèle *in vitro*, il a été montré que les DC infectées par LASV induisaient des réponses T CD4+ et CD8+ faibles et retardées tandis que son homologue non pathogène MOPV activait les cellules T CD4+ et CD8+ conduisant au développement de cellules mémoires et au contrôle de l'infection [257].

Des travaux ont montré que, lors des interactions NK/DC, les cellules NK permettaient d'orienter les DC vers un profil conduisant à l'initiation des réponses T Th1 et cytotoxiques [350]. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'influence des cellules NK sur la stimulation des cellules T par les DC infectées

et sur l'orientation Th1 de la réponse induite à l'aide de modèles *in vitro* classiquement utilisés [350, 431]. De plus, des investigations *in vivo* sont nécessaires afin de préciser le rôle des cellules NK sur l'activation des DC et les conséquences des interactions NK/DC sur l'induction des réponses immunitaires adaptatives.

Des travaux *in vitro* ont montré que les cellules NK activent la maturation des DC infectées par HIV-1 et également des DC non infectées par l'intermédiaire du facteur HMGB1 [431]. Cependant, les DC ainsi activées par les cellules NK ne sont pas capables d'induire l'orientation Th1 de la réponse T. L'IL-12 et l'IL-18 sont impliquées dans la non fonctionnalité de ce dialogue. HMGB1 est une protéine nucléaire qui agit comme un facteur de transcription et induit l'expression de nombreux gènes. Ce facteur est sécrété par les cellules NK, les DC et les macrophages activés et il est impliqué dans l'activation et la migration des DC, la prolifération et la survie des cellules T spécifiques et l'orientation Th1 des réponses adaptatives [447]. La présence de HMGB1 n'a jamais été évaluée *in vivo* chez les patients ou les PNH infectés par LASV ni dans des modèles *in vitro*. D'autres expériences sont donc requises afin de déterminer si ce facteur est sécrété lors de la fièvre de Lassa et s'il pourrait jouer un rôle dans l'induction des réponses T.

Les cellules NK peuvent également avoir un rôle immunopathologique lors d'une infection virale et interférer avec le développement des réponses immunitaires. Des données récentes ont montré que les cellules NK affectent la réponse des cellules T *in vivo* chez la souris infectée par LCMV [448, 449]. En effet, des souris ne possédant pas de cellules NK sont capables de contrôler rapidement l'infection par LCMV *via* la réponse des lymphocytes T CD8+ et ainsi d'empêcher l'inflammation du foie médiée par le virus. Les cellules NK participent ainsi à cette inflammation en éliminant les cellules T CD4+ et donc les réponses des cellules T CD8+. Ces données sont cependant controversées car une autre étude a montré que chez les souris immunocompétentes, les cellules NK n'influencent pas la réponse des cellules T en réponse à LCMV [450]. D'autres études sont donc nécessaires afin de préciser si les cellules NK sont en mesure de lyser les cellules T cytotoxiques spécifiques de LASV et si elles sont ainsi susceptibles de participer à la pathogenèse lors de la fièvre de Lassa.

Les cellules NK s'activent en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV

Ensuite, l'activation des cellules NK a été analysée en présence de macrophages infectés par LASV ou MOPV. Les résultats sont regroupés dans le tableau VI ci-dessous.

Tableau VI. Bilan des réponses des cellules NK induites en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV, en comparaison avec la stimulation par du LPS ou l'IL-2/PHA. Le signe ≈ indique que le résultat a été observé au cours des expériences mais n'est pas significatif.

	Infection		Stimulation	
	LASV	MOPV	LPS	IL-2/PHA
Activation	↑ CD69	↑ CD69	↑↑ CD69 ↑ HLA-DR, CD25	↑↑ CD69 ↑ HLA-DR, CD25
Prolifération	↑ Ki67	↑ Ki67		
Migration	↓ CXCR3	↓ CXCR3	↓ CXCR3	↓ CXCR3
Production de cytokines	↑ IFN-γ, TNF-α (ARNm)	↑ IFN-γ, TNF-α, TNF-β (ARNm)	↑↑ IFN-γ (ARNm et protéine) ↑ TNF-α, TNF-β (ARNm)	↑↑ IFN-γ (ARNm et protéine) ↑ TNF-α, TNF-β (ARNm)
Cytotoxicité	↑ NKp30 ↑ NKP44	↑ NKp30 ≈↑ NKP44	↓ NKp30 ↑ NKP44 ↓ NKG2D	≈↑ NKP44 ↓ NKG2D
	↑ GrzB (protéine)	↑ GrzB (protéine)	↑ GrzB (ARNm et protéine)	↑ GrzB (ARNm et protéine)
	↑ FasL, TRAIL (ARNm)	↑ FasL, TRAIL (ARNm)	?	?
	↑ lyse des cellules K562	↑ lyse des cellules K562		↑ lyse des cellules K562

Contrairement aux cocultures NK/DC, l'expression de CD69 et dans une moindre mesure de NKp44 est augmentée en présence de macrophages infectés par LASV et MOPV. Ces résultats démontrent que les cellules NK s'activent dans les cocultures NK/macrophages lors de l'infection par ces virus. De plus, l'augmentation de l'expression de CD69 à la surface des cellules NK n'est pas modulée en réponse aux virus inactivés suggérant que la réplication virale est nécessaire à l'activation des cellules NK. Le répertoire des récepteurs activateurs et inhibiteurs est modulé lors de certaines infections virales. En effet, l'expression de NKG2D augmente lors de l'infection par le virus de

l'hépatite B humaine [415]. L'expression de certains KIR et des récepteurs NKp30, NKp44 et NKp46 est diminuée à la surface des cellules NK chez les patients infectés par HIV-1 [418, 419]. Lors de l'infection par LASV et MOPV, l'expression de NKp30 et NKp44 augmente en présence de macrophages alors que l'expression de CD158b, NKp46 et NKG2D n'est pas affectée. Les résultats présentés dans cette thèse ont montré que le contact cellulaire entre les cellules NK et les macrophages est requis pour l'augmentation de l'expression de CD69 et NKp30, mais que l'engagement des molécules CD40L et NKG2D n'est pas impliqué. NKp44 et NKp46 semblent intervenir dans l'augmentation de NKp30 probablement par un mécanisme de coopération entre les NCR. L'influence d'autres molécules comme par exemple 2B4 et CD48 dans l'activation des cellules NK et dans les interactions avec les macrophages infectés par LASV et MOPV reste à déterminer. Il est apparu, en effet, que ces deux récepteurs étaient cruciaux pour l'induction de l'activation des cellules NK par les macrophages [404]. En plus du contact cellulaire avec les macrophages, les IFN de type I sécrétés sont impliqués dans la modulation de l'expression de CD69 et NKp30.

L'activation des cellules NK observées en réponse aux macrophages infectés par LASV et MOPV est particulièrement intéressante car elle presque aussi robuste que celle induite par les macrophages-LPS ou l'IL-2/PHA (tableau VI). Les cellules NK présentent néanmoins un phénotype différent. Les marqueurs d'activation CD69, HLA-DR et CD25 sont fortement exprimés à la surface des cellules NK lors de la stimulation par le LPS ou l'IL-2/PHA, alors que seule l'expression de CD69 est augmentée lors de l'infection par LASV et MOPV. Contrairement au LPS et à l'IL-2/PHA, la stimulation par des macrophages infectés par ces virus induit la prolifération des cellules NK comme en témoigne l'augmentation de l'expression de Ki67. De façon surprenante, l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D diminue à la surface des cellules NK en présence de macrophages stimulés par le LPS ou lors de l'addition d'IL-2/PHA ce qui n'est pas le cas lors de l'infection par LASV et MOPV.

L'activation des cellules NK lors de l'infection par MOPV est attendue car il a été montré lors de travaux précédents au laboratoire, et au cours de cette thèse, que les macrophages sont fortement et rapidement activés lors de l'infection par MOPV [217]. De façon surprenante, les macrophages induisent également la réponse des cellules NK lors de l'infection par LASV. Or, il a été montré que les macrophages infectés par LASV ne sont que faiblement activés et ne produisent que de faibles taux d'IFN de type I [75, 238]. Il a de plus été observé que la présence de cellules NK n'augmente pas la production de IFN de type I, ni n'active la production d'IL-12, IL-15 et IL-18 par les macrophages. Une explication probable est que l'activation modeste des macrophages pourrait permettre d'initier une boucle positive d'activation entre les macrophages et les cellules NK, et finalement conduire à une forte activation des cellules NK [425, 427, 429]. En effet, nous avons observé que l'activation

des macrophages semblait être plus intense en présence de cellules NK par rapport aux cultures de macrophages seuls au regard de l'expression des molécules CD40, CD80 et CD86. Il serait intéressant de déterminer si cette activation réciproque des macrophages et des cellules NK se produit chez les patients ou les PNH lors de la fièvre de Lassa. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, en accord avec ceux publiés précédemment par notre laboratoire [75, 217], démontrent ainsi que l'activation des macrophages semble être cruciale dans le contrôle de l'infection par les Arénavirus. Un tel mécanisme d'activation réciproque des cellules NK et des macrophages pourrait jouer un rôle chez les survivants. Malgré des différences d'activation des macrophages lors des infections par LASV et MOPV, nous n'avons pas observé de différences majeures de réponses des cellules NK. Nos résultats n'ont donc pas permis de corrélérer l'état d'activation des cellules NK à la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV. Cependant, il est possible que leurs capacités différentes à activer les macrophages jouent un rôle non négligeable dans la différence de pathogénicité. Des investigations *in vivo* chez les PNH sont cependant nécessaires afin de préciser le rôle des cellules NK sur l'activation des macrophages *in vivo* et les conséquences sur l'issue de la maladie.

De nombreuses études ont montré que les contacts entre les cellules NK et les DC ou macrophages sont primordiaux pour induire l'activation optimale des cellules NK [394, 408, 427]. Nos résultats ont démontré que le contact entre les cellules NK et les macrophages infectés par LASV et MOPV est requis pour permettre l'activation et augmenter le potentiel cytotoxique des cellules NK comme en témoigne l'expression de CD69 et GrzB. L'engagement de CD40L ainsi que des récepteurs activateurs NKG2D, NKp30, NKp44 ou NKp46 ne semble pas être impliqué dans l'activation des cellules NK. Ces observations indiquent que d'autres molécules interviennent dans les interactions entre les cellules NK et les macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV. Des travaux ont montré que les cytokines produites par les DC peuvent être délivrées directement dans le cytoplasme des cellules NK *via* la synapse immunologique [395]. Le contact cellulaire et notamment la présence du récepteur de l'IL-12 à la surface des cellules NK sont cruciaux pour l'activation des cellules NK par les macrophages infectés par *Salmonella* [427]. Un tel mécanisme pourrait être étudié dans notre modèle.

Les résultats présentés ici ont montré que CXCR3 est surexprimé à la surface des cellules NK en réponse directe à LASV et MOPV mais que son expression diminue lors de la stimulation par des macrophages infectés. Le rôle de la diminution de l'expression de ce récepteur lors de la fièvre de Lassa n'est pas connu. Plusieurs facteurs tels que la modulation de la transcription/traduction ou l'internalisation et le recyclage du récepteur pourraient être à l'origine de la diminution de l'expression de CXCR3 à la surface des cellules NK. Il est cependant peu probable que la diminution

de l'expression de CXCR₃ soit le résultat d'une modulation de la transcription car l'analyse des ARNm codant CXCR₃ n'a révélé aucun changement au cours de l'infection par LASV ou MOPV (données non présentées).

L'engagement du récepteur CXCR₃ avec ses ligands entraîne l'internalisation de ce récepteur [451]. La diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK pourrait s'expliquer par l'internalisation du récepteur suite à la liaison par les CXC chemokines produites pendant l'infection. Cette hypothèse s'accorde avec les données présentées ici dans les expériences « *Transwell* ». En effet, l'expression de CXCR₃ reste diminuée à la surface des cellules NK lorsque le contact cellulaire est inhibé suggérant que des facteurs solubles sont impliqués dans la modulation de l'expression de ce récepteur. CXCR₃ est le récepteur des chemokines inflammatoires CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁, initialement décrites comme attirant les lymphocytes T activés [452-454]. Lors de l'infection par LASV et MOPV, ces chemokines sont sécrétées en grande quantité par les macrophages *in vitro* (Pannetier et al., manuscrit en préparation). Nos résultats ont également montré que LASV et MOPV induisent la production de CXCL₁₁ dans les cocultures NK/macrophages. Enfin, des taux importants d'ARNm codant CXCL₁₀ et CXCL₁₁ ont été détectés dans les PBMC et dans les ganglions lymphatiques de singes cynomolgus infectés par LASV [100]. Par ailleurs, lors de l'ajout d'anticorps neutralisants CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁ dans les cocultures NK/macrophages, la diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK semble être plus modérée lors de l'infection par LASV et MOPV. Cependant, des concentrations plus élevées d'anticorps neutralisants sont peut être nécessaires pour bloquer totalement l'action des CXC chemokines produites par les macrophages.

Nous avons observé que CXCR₃ est surexprimé de façon basale lors de l'ajout d'anticorps neutralisant IFNAR et IFN- α . Les IFN de type I sont également impliqués dans l'induction des ligands de CXCR₃, comme CXCL₁₀ et CXCL₁₁ [455]. La neutralisation des IFN de type I sécrétés par les macrophages pourrait entraîner la diminution de la production des CXC chemokines et ainsi la réduction de l'internalisation de CXCR₃ suite à l'engagement avec ses ligands. Cette hypothèse pourrait alors expliquer d'une part l'augmentation du niveau basal de l'expression de CXCR₃ et d'autre part la diminution plus modérée de l'expression de CXCR₃ à la surfaces de cellules NK lors de l'infection par LASV et MOPV.

D'autres facteurs peuvent expliquer la diminution de l'expression de CXCR₃. Ainsi, il a récemment été montré que la forme soluble du CMH I non classique, HLA-G, entraînait la diminution de l'expression de CXCR₃ à la surface des cellules NK et l'inhibition de la migration en réponse aux chemokines CXCL₁₀ et CXCL₁₁ [456]. Des isoformes de HLA-G membranaire ou sa forme soluble sont surexprimées lors de certaines infections virales. En effet, le virus herpès simplex de type 1 et le

virus de la rage induisent l'augmentation de l'expression de certaines molécules HLA-G [457]. HLA-G joue un rôle négatif sur les réponses des cellules NK. Cette molécule inhibe les fonctions cytotoxiques des cellules NK et semble être capable de réguler le profil des cytokines sécrétées. En parallèle, elle peut activer la lyse fratricide des cellules NK entre elles. La régulation de l'expression de HLA-G et de sa forme soluble n'est pas connue lors de la fièvre de Lassa. D'autres investigations sont donc nécessaires afin d'étudier la présence de ces molécules et de déterminer si elles peuvent participer à la régulation de l'expression de CXCR₃, de la migration et plus généralement des réponses des cellules NK.

Grâce à l'expression de récepteurs de chemokines comme CXCR₃, les cellules NK sont capables de migrer en réponse à des signaux chimiotactiques. Il a été observé chez le PNH infecté par LASV que les cellules NK disparaissaient transitoirement du sang circulant [100]. Ces résultats suggèrent qu'elles pourraient être recrutées dans d'autres tissus ou simplement éliminées. Une lymphopénie transitoire est également observée dans le sang lors de l'infection de macaques par LCMV [433]. Dans ce modèle, elle a été caractérisée d'une part par la relocalisation des cellules NK au niveau des tissus périphériques et d'autre part par la mort cellulaire. Il a été montré que les cellules NK rejoignent les tissus enflammés à la périphérie lors de la liaison avec les chemokines CXCL₉, CXCL₁₀ et CXCL₁₁ [381]. Les ligands de CXCR₃, sécrétés par les CPA infectées par LASV dans les vaisseaux sanguins, pourraient induire la désensibilisation rapide et l'internalisation de CXCR₃, entraînant ainsi la relocalisation de ces cellules dans les organes périphériques. Des études chez la souris ont montré que CXCR₃ est impliqué dans la migration des cellules NK vers les organes périphériques lors de l'inflammation [458]. CXCR₃ est impliqué dans le recrutement rapide des cellules NK dans les ganglions lymphatiques [387]. Les cellules NK rejoignent la rate en réponse à une stimulation par l'IFN- γ par un mécanisme dépendant de CXCR₃ [459]. Lors de l'infection par LASV, les cellules NK pourraient rejoindre les organes dans lesquels le virus se réplique, comme les organes lymphoïdes secondaires ou le foie. De plus, lors de l'infection de souris par LCMV, les cellules NK sont recrutées au niveau du foie [460]. L'inflammation hépatique est un événement majeur au cours de la fièvre de Lassa mais l'implication des cellules NK dans ce mécanisme n'est pas connue. L'augmentation de l'expression de CD69 à la surface des cellules NK après stimulation par les macrophages infectés s'accorde avec l'hypothèse de la migration des cellules NK vers les sites de l'inflammation lors de la fièvre de Lassa. Le rôle physiologique de CD69 est peu connu mais des travaux ont montré que cette molécule est impliquée dans la régulation de la migration des thymocytes lors du développement des lymphocytes. De façon similaire, il a été proposé que CD69 puisse participer à la migration des cellules NK vers les organes lymphoïdes secondaires [351 548].

Il a été montré que les cellules NK prolifèrent de façon modeste mais significative en réponse aux macrophages infectés par LASV et MOPV. Cette faible prolifération des cellules NK peut s'expliquer par le fait que dans notre modèle, les cellules NK ont été isolées du sang. Elles comprennent ainsi plus de 90% de cellules de la sous-population CD56^{dim} CD16⁺ qui ont une faible capacité de prolifération [352]. Une forte expansion des cellules n'était donc pas attendue. Il est toutefois à noter que les macrophages infectés par LASV et MOPV semblaient cependant induire la prolifération des cellules NK des deux sous-populations CD56^{bright} et CD56^{dim} CD16⁺ dans notre modèle (données non présentées).

L'existence d'une prolifération des cellules NK similaire à l'expansion clonale des cellules T est controversée chez l'homme. Il semble que les cytokines telles que l'IL-2 permettraient d'induire en priorité l'expansion clonale des lymphocytes T et non la prolifération des cellules NK. Cette hypothèse s'accorde avec nos observations démontrant que les cellules NK n'expriment pas CD25, la chaîne α du récepteur de l'IL-2, lors de l'infection par LASV et MOPV. L'expansion clonale est définie comme une prolifération intense et spécifique de l'antigène des lymphocytes T et B. Or, la réponse des cellules NK est a priori non spécifique de l'antigène. Des études ont cependant montré que certaines sous-populations de cellules NK peuvent subir une phase d'expansion clonale en réponse à certains virus et ce, de façon similaire aux lymphocytes T et B. En effet, les cellules NK caractérisées par une forte expression de NKG2C prolifèrent fortement et contrôlent l'infection par le cytomégalovirus humain [461]. De plus, les cellules NK NKG2C⁺ prolifèrent et persistent longtemps chez les patients lors de l'infection par l'Hantavirus Puumala [462].

L'importance de la prolifération des cellules NK dans le contrôle des infections virales *in vivo* est peu connue. Certains ont proposé que la prolifération des cellules NK puisse être associée au développement d'une mémoire immunitaire innée. En effet, des cellules NK ayant des caractéristiques de cellules mémoires ont récemment été découvertes chez la souris lors de l'infection par le cytomégalovirus murin [463]. En effet, ces cellules NK Ly49H⁺ sont capables de subir plusieurs phases d'expansion en réponse au virus lors d'un transfert adoptif et de plus, apparaissent spécifiques de l'antigène. L'existence de telles cellules NK mémoires n'est pas connue chez l'homme mais certains travaux suggèrent qu'elles sont présentes lors de certaines infections virales. En effet, lors de l'infection par le cytomégalovirus humain, la sous-population de cellules NK NKG2C^{high} prolifère puis acquiert l'expression de la molécule CD57, suggérant que cette molécule pourrait être un marqueur de cellules NK mémoires, comme c'est le cas pour les lymphocytes T [461]. D'autres études sont requises afin de mettre en évidence la présence de cellules NK CD57⁺ et NKG2C^{high} notamment parmi les cellules NK qui prolifèrent dans notre modèle. Il n'y a aucune donnée indiquant le développement de telles cellules NK mémoires lors de la fièvre de Lassa. De

plus, des analyses sont nécessaires pour étudier l'existence de cellules NK ayant des caractéristiques de cellules mémoires *in vivo* chez les patients survivants ou dans un modèle animal.

Les cellules NK activées par les macrophages infectés ne produisent pas de cytokines

Les cellules NK activées peuvent sécréter de nombreuses cytokines comme le TNF- α , le TNF- β et l'IFN- γ .

Le TNF- α est produit majoritairement par les macrophages activés au niveau systémique. Il joue de nombreux rôles dans la régulation de l'inflammation dont l'induction de la mort cellulaire par l'intermédiaire du récepteur de mort TNF-R. Le TNF- β est sécrété par les lymphocytes T et les cellules NK. Comme le TNF- α , le TNF- β joue un rôle dans l'inflammation mais plus localement [464]. Les résultats présentés ici ainsi que les études précédentes réalisées au laboratoire ont démontré que les macrophages infectés par MOPV induisent la production des ARNm codant le TNF- α mais cette cytokine n'est pas détectée dans les surnageants de culture [217]. Ces quantités de TNF- α sont similaires dans les cocultures de cellules NK et de macrophages infectés par LASV et MOPV. Ces observations indiquent que les cellules NK ne produisent pas de TNF- α , ni n'augmentent la sécrétion de cette cytokine par les macrophages infectés. L'infection par MOPV, mais pas par LASV, induit la transcription du gène codant le TNF- β dans les cocultures NK/macrophages mais la présence de la protéine n'a pas été étudiée.

Parmi les cytokines sécrétées par les cellules NK, l'IFN- γ est une cytokine essentielle dans l'initiation et la régulation des réponses d'adaptatives [387] mais aussi pour le contrôle de la réplication de nombreux virus. Cependant, il a été montré que l'IFN- γ ne contrôle pas la réplication de LASV dans les CPA ainsi que dans d'autres populations cellulaires [238, 465]. Ces données suggèrent que les cytokines classiquement sécrétées par les cellules NK ne semblent pas jouer un rôle primordial dans le contrôle de la fièvre de Lassa.

Dans notre modèle *in vitro*, de très faibles niveaux d'expression d'ARNm codant l'IFN- γ sont induits par les cellules NK en réponse à des macrophages infectés par LASV. Cependant, cette cytokine n'est pas détectée au niveau protéique ni à l'intérieur des cellules NK ni dans les surnageants de coculture. Ces résultats sont cohérents avec les études chez les patients et les PNH indiquant que l'IFN- γ n'est pas détecté lors de l'infection par LASV [100]. La production d'IFN- γ par les cellules NK se limite également à la synthèse d'ARNm lors de l'infection par MOPV. Ces observations suggèrent ainsi que la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV n'est pas corrélée à une différence de production d'IFN- γ . L'IFN- γ produit par les cellules NK dans les ganglions lymphatiques joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes T et permet d'orienter la réponse T vers un profil

de type Th1 [387]. L'absence de production d'IFN- γ par les cellules NK lors de l'infection par LASV pourrait *in vivo* contribuer à l'absence de réponses T fonctionnelles.

Les réponses des cellules NK ont été peu étudiées chez l'homme lors de la fièvre de Lassa. Par contre, il existe de nombreuses études réalisées lors de l'infection par LCMV dans un modèle souris [432]. Ces données permettent d'apporter des outils intéressants pour la compréhension des mécanismes immunitaires impliquant les cellules NK lors de la fièvre de Lassa. L'IFN- γ est rarement induit lors de l'infection des souris immunocompétentes par LCMV [240 553, 434 552]. Des études dans ce modèle ont été poursuivies afin d'expliquer l'absence de sécrétion d'IFN- γ au cours de l'infection par LCMV. L'IL-12, sécrétée par les CPA et les neutrophiles, est un inducteur bien connu de la production d'IFN- γ médiée par les cellules T et les cellules NK [394, 395]. Or, cette cytokine n'est induite ni *in vitro* lors de l'infection par LASV et MOPV d'après les résultats présentés ici, ni *in vivo* chez la souris lors de l'infection par LCMV [432]. L'absence de production d'IFN- γ par les cellules NK pourrait ainsi s'expliquer, au moins en partie, par l'absence de sécrétion d'IL-12 par les CPA infectées. Par ailleurs, d'autres études chez la souris ont montré que de forts taux d'IFN- α/β inhibent la sécrétion d'IL-12 par les CPA et donc la production d'IFN- γ par les cellules NK [437]. Malgré les faibles quantités d'IFN de type I détectées dans notre modèle en réponse à LASV, ces cytokines pourraient être en mesure de participer à l'inhibition de l'IL-12 par les CPA et donc à l'inhibition de la production d'IFN- γ par les cellules NK. L'existence de ce mécanisme lors de l'infection par LASV pourrait être étudiée dans notre modèle. En effet, il serait intéressant de déterminer si l'ajout d'IL-12 recombinante suffit à induire la production d'IFN- γ lors de l'infection ou si d'autres facteurs sont requis. En effet, l'IL-15 et l'IL18 entraînent également la production de cytokines par les cellules NK [396, 466]. Cependant, ni LASV ni MOPV n'induisent la transcription de ces cytokines par les CPA. Nous avons voulu confirmer que l'absence de production d'IFN- γ par les cellules NK était bien une caractéristique des infections par LASV et MOPV et pas un artéfact lié au modèle *in vitro* utilisé. Pour cela, la production de cytokines par les cellules NK a été évaluée au sein d'une population de PBMC afin de déterminer si des signaux de costimulation délivrés par les PBMC sont requis pour l'induction de la production de cytokines par les cellules NK [424, 425, 427]. Les cellules NK s'activent mais ne produisent pas de cytokine en réponse à des macrophages infectés par LASV ou MOPV (données non présentées). Ces observations suggèrent qu'au contact de macrophages infectés par ces virus, les PBMC ne délivrent pas de signaux de costimulation aux cellules NK et indiquent que l'absence de production d'IFN- γ par les cellules NK est une caractéristique des infections par LASV et MOPV.

Les IFN- α/β se lient au récepteur IFNAR et induisent une cascade de signalisation entraînant la transcription de nombreux gènes *via* les facteurs de transcription STAT. Ils peuvent notamment

déclencher des réponses opposées médiées par STAT₁ et STAT₄. En effet, STAT₄ active la production d'IFN- γ par les cellules NK alors que STAT₁ a plutôt un rôle inhibiteur [434, 467]. En effet, des expériences chez la souris ont suggéré que l'IFN- γ pouvait être sécrété lors de l'infection par LCMV sur les premiers sites de l'inflammation par l'intermédiaire des IFN de type I et de STAT₄ jusqu'à ce que l'expression de STAT₁ ne soit trop forte et inhibe ce mécanisme. L'expression de STAT₁ est augmentée dans le sang et le foie de singes infectés par la souche WE de LCMV, un modèle de la fièvre de Lassa [109, 241]. Ces observations suggèrent que la surexpression de STAT₁ pourrait être à l'origine de l'absence de sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK. L'étude de la régulation de la balance STAT₁/STAT₄ dans les cellules NK lors de l'infection par LASV pourrait fournir des informations intéressantes afin de comprendre la régulation des réponses des cellules NK. De plus, STAT₄ est également impliqué dans l'orientation de la réponse T [468]. Ainsi, l'étude de ce facteur pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire globale mis en jeu lors de la fièvre de Lassa.

Les cellules NK activées par les macrophages infectés par LASV et MOPV ont des capacités cytotoxiques augmentées

L'activation de la lyse médiée par les cellules NK est régulée par un ensemble de signaux activateurs transmis par les NCR ou NKG2D et de signaux inhibiteurs donnés par les molécules du CMH de classe I. Les cellules NK activées peuvent lyser les cellules cibles par deux mécanismes différents : la voie des récepteurs de mort et la voie Perforine/Grz. Lors de la reconnaissance d'une cellule infectée, les cellules NK peuvent exprimer les ligands TNF- α , FasL et TRAIL des récepteurs de morts et/ou dégranuler le contenu des vésicules cytolytiques (Perforine/Grz). Nous avons étudié le potentiel cytotoxique des cellules NK en analysant l'expression des récepteurs activateurs (NKP30, NKP44, NKP46 et NKG2D) et inhibiteur (CD158b) et les molécules lytiques FasL, TRAIL, Grz et Perforine. Enfin, l'étude de l'expression de du marqueur CD107a, exposé à la surface cellulaire après dégranulation [439], a permis d'analyser la lyse de cellules sensibles telles que la lignée K562 ou les cellules infectées.

Les résultats ont montré que, lors de l'infection des macrophages par LASV et MOPV, les cellules NK acquièrent des propriétés cytolytiques contre la lignée cellulaire sensible K562. L'expression des récepteurs activateurs NKP30 et NKP44, impliqués dans la cytotoxicité naturelle, augmente à la surface des cellules NK en présence de macrophages infectés ainsi que l'expression intracellulaire de la molécule lytique GrzB. De plus, des ARNm codant FasL et TRAIL ont été détectés dans les cocultures de macrophages infectés par LASV ou MOPV et de cellules NK.

Lors de l'infection par LASV et MOPV, les IFN de type I produits par les macrophages semblent être requis pour l'activation des cellules NK, même à faible dose. De plus, les résultats présentés ici ont montré que les IFN de type I étaient impliqués dans la modulation de l'expression de Grz. De même, il a été également montré que la cytotoxicité médiée par les cellules NK lors de l'infection par LCMV nécessitait l'IFN- α/β [432]. En revanche, il a été montré que le TGF- β pouvait inhiber la cytotoxicité des cellules NK [469]. Lors de l'infection des souris LCMV, le TGF- β induit le développement de cellules T qui régulent négativement les cellules NK [470]. Bien qu'il n'existe aucune donnée à ce jour, le TGF- β pourrait être impliqué dans l'inhibition de l'activité des cellules NK au cours de l'infection par LASV.

Les cellules NK activées ne lysent pas les cellules infectées

Cependant, malgré des propriétés cytotoxiques élevées, les cellules NK demeurent incapables de lyser en retour les macrophages infectés. Ces résultats sont en adéquation avec d'autres études démontrant notamment que les cellules NK ne participent pas au contrôle de l'infection par LCMV [471]. A l'opposé, la cytotoxicité médiée par les cellules NK semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'infection par l'arénavirus PICV chez la souris [472 556].

La lyse médiée par les cellules NK est contrôlée par un équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs. Ainsi, l'absence de lyse des CPA infectées par les cellules NK est en accord avec des données publiées au laboratoire [75] et avec les résultats décrits précédemment. En effet, les CPA infectées par LASV et MOPV expriment la molécule du CMH I HLA-abc délivrant potentiellement ainsi un signal inhibiteur aux cellules NK. De plus, l'expression de CD158b, un récepteur inhibiteur de la famille des KIR, n'est pas modulée en réponse à l'infection par LASV et MOPV. Les résultats présentés ici ont également montré que les CPA infectées n'expriment pas les molécules Mic-A/B, des ligands du récepteur activateur NKG2D. Ainsi, la présence de signaux inhibiteurs et l'absence de signaux activateurs suggérées par nos résultats pourraient expliquer l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK contre les CPA infectées par LASV et MOPV. L'inhibition de l'expression des ligands Mic-A/B de NKG2D est aussi une caractéristique de l'infection par le cytomégalovirus, le virus de la grippe A et le virus de l'hépatite C humaine [411, 429, 442] alors que ces molécules sont induites à la surface des macrophages lors de la stimulation par du LPS [404]. En revanche, ils sont induits dans ce modèle lors de l'ajout d'IFN- α recombinant. Le rôle des IFN de type I dans l'induction de ces ligands reste à déterminer dans notre modèle. Nous ne nous sommes intéressés qu'à l'expression d'un nombre limité de récepteurs des cellules NK et de ligands sur les CPA infectées. Des travaux ont montré que l'expression du récepteur inhibiteur CD85j était diminuée à la surface des cellules NK lors de l'infection par HIV-1 [420]. Ce récepteur est impliqué dans la lyse de DC infectées par HIV-1 médiée par les cellules NK et les cellules NK CD85j+ sont capables de contrôler la réplication de HIV-1 dans les DC. L'influence de cette sous-population de cellules NK n'est pas connue lors de l'infection par LASV et MOPV. Par ailleurs, il existe de nombreuses molécules permettant de délivrer un signal activateur. Comme Mic-A/B, les ULBP se lient au récepteur NKG2D et induisent la cytotoxicité des cellules NK [473]. Leur expression pourrait être analysée à la surface des cellules infectées par LASV et MOPV. Les ligands des NCR sont également impliqués dans la lyse des cellules infectées par les cellules NK. Par exemple, malgré l'absence des ligands de NKG2D et la présence des molécules du CMH-I, les cellules NK sont capables de lyser d'une part, des cellules

infectées par le virus de la vaccine et d'autre part, des cellules infectées par le virus herpès simplex, et ce, grâce à l'induction des ligands des NCR à la surface des cellules infectées [474, 475]. En revanche, HIV-1 empêche l'exposition du ligand de NKp44 à la surface des cellules T CD4 infectées et réduit la susceptibilité de ces cellules à la lyse médiée par les cellules NK [430]. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'expression d'autres ligands activateurs à la surface des cellules infectées afin de préciser l'absence de lyse par les cellules NK.

L'absence de lyse des cellules infectées par les cellules NK ne semble pas être liée à un défaut d'activation des cellules NK car il a été observé que les cellules NK activées par de l'IL-2/PHA n'étaient pas capables de lyser les cellules infectées. Des stimulations par d'autres molécules activatrices des cellules NK sont cependant nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Finalement, il a été suggéré que LASV et MOPV pourraient inhiber la lyse médiée par les cellules NK, par un mécanisme lui permettant de se répliquer dans les cellules cibles sans être détecté par les cellules de la réponse immunitaire. LASV et MOPV pourraient ainsi inhiber l'apoptose, comme cela a été montré pour d'autres infections virales [476]. Cette hypothèse est conforme à la nature non cytopathique des infections par les Arénavirus et permettrait au virus de persister et de diffuser dans tout l'organisme.

Des travaux ont montré que la protéine Z de LASV et LCMV interagissait avec la PML, une protéine présente au niveau des corps nucléaires et jouant un rôle dans la régulation de l'apoptose [155]. La présence de la protéine Z dans les cellules induit la relocalisation de la PML des corps nucléaires vers le cytoplasme. Ces données suggèrent que la protéine Z pourrait interférer avec le fonctionnement normal de la PML et ainsi inhiber l'apoptose. De plus, la PML est induite par l'IFN [477] et son expression est corrélée avec celle des molécules du CMH I. En effet, il a été montré que la PML pouvait participer à la régulation de l'expression des gènes du CMH I tels que LMP-2 et LMP-7, impliqués dans la dégradation des antigènes viraux permettant la formation des complexes CMH/peptide, ou TAP-1 ou TAP-2, impliqués dans le transport de ces complexes à la surface des CPA [478]. Il pourrait être intéressant d'étudier l'expression des différents gènes du CMH I lors de l'infection des CPA par LASV et MOPV. Toutes ces données suggèrent que LASV, LCMV et les autres Arénavirus pourraient entraîner une résistance à la mort des cellules infectées par l'interaction de la protéine Z avec la PML soit en inhibant directement l'apoptose, soit en modulant l'expression des molécules du CMH I et ainsi la lyse médiée par les cellules NK.

Par ailleurs, les virus sont capables de réguler les voies de l'apoptose par de nombreux mécanismes. Il existe deux grandes voies de l'apoptose. La voie intrinsèque est initiée par des signaux internes et aboutit à la formation de pores dans la membrane de la mitochondrie et ainsi, au relargage du

cytochrome c. La voie extrinsèque de l'apoptose est contrôlée par les récepteurs de morts et est induite par des stimuli externes tels que les molécules FasL et TRAIL. Ces deux cascades de signalisation peuvent s'entrecroiser et aboutissent à l'activation des caspases et à la mort cellulaire. Un des mécanismes utilisés par les virus est la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose. Par exemple, il a été montré que la protéine Tax du virus T-lymphotropique humain de type 1 (HTLV-1) induit l'augmentation de la synthèse du gène anti-apoptotique Bcl-xL dans des cellules T humaines [479]. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé la transcription de gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 et Bfl1/A1), ainsi que la transcription de certains gènes pro-apoptotiques. L'expression des gènes codant des molécules interférant avec l'apoptose induite par la voie des récepteurs de morts comme les protéines cellulaires inhibitrices de l'apoptose (cIAP) 1 et 2 et la protéine cFLIP, a été également étudiée. Des résultats préliminaires ont montré que l'expression de ces molécules par les DC et les macrophages ne semblait pas être modifiée de façon importante lors de l'infection par LASV ou MOPV. Toutefois, une augmentation modérée de la synthèse de Bcl-2 et cIAP2 par les macrophages infectés par MOPV a été observée (données non présentées). Ces premiers résultats doivent cependant être reproduits. En plus de la régulation de la transcription, les virus peuvent également interférer avec d'autres étapes de l'apoptose. En effet, il a été montré que la protéine Nef de HIV-1 ainsi que la protéine US3 du virus herpès simplex de type 1 inhibent l'activité pro-apoptotique de la protéine Bad en induisant sa phosphorylation [480, 481]. La protéine CrmA des Poxvirus inhibe l'apoptose induite par la voie des récepteurs de mort [482]. Plus récemment, il a été montré que l'infection par JUNV, un Arénavirus du nouveau monde, conduisait à l'inhibition de l'apoptose par l'intermédiaire de la NP. Cette protéine sert de leurre et elle est clivée par les caspases à la place des autres caspases de la cascade d'apoptose [483].

Les virus peuvent interférer avec la voie de signalisation des récepteurs de mort. Il a été observé que la synthèse des ligands FasL et TRAIL des récepteurs de mort était augmentée dans les cocultures NK/macrophages lors de l'infection par LASV et MOPV. Ce mécanisme est favorable à l'hôte puisqu'il peut conduire à l'élimination des cellules infectées et au contrôle de l'infection. L'induction de ces molécules par les virus peut également entraîner l'élimination de cellules impliquées dans la réponse immunitaire, contribuer à l'immunosuppression et favoriser la dissémination du virus. Par ailleurs, la modulation de l'expression de ces récepteurs à la surface des cellules infectées est un mécanisme utilisé par certains virus pour inhiber l'apoptose. En effet, les Adénovirus sont capables d'induire l'internalisation du récepteur Fas et ainsi d'inhiber l'apoptose [484]. Il existe des récepteurs de TRAIL ayant des fonctions diverses. Les récepteurs TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) sont fonctionnels et induisent l'apoptose via l'activation des caspases. En revanche, TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2) sont des récepteurs leurres (« *decoy* ») non fonctionnels qui interfèrent avec les

signaux donnés par TRAIL sur les autres récepteurs [485]. L'expression des récepteurs Fas et TRAIL-R à la surface des CPA infectées n'est pas connue et devrait être étudiée.

Les cellules NK s'activent en présence de DC et de macrophages infectés par des LASV mutants

Afin de disséquer le rôle de la réponse IFN de type I dans l'activation des cellules NK, des LASV recombinants générés au laboratoire par génétique inverse ont été utilisés. Des virus doubles mutants LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A ont été utilisés car ils induisent une production importante d'IFN de type I par les macrophages infectées [174]. Les LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A possèdent deux mutations : en position 389, l'acide aspartique a été remplacé par une thréonine ou une alanine et en position 392, une alanine remplace la glycine. Ces virus ont été comparés avec un LASV sauvage également obtenu par génétique inverse (LASV-Rec), se comportant exactement comme LASV sauvage et avec un recombinant LASV NP-R393A, comportant une alanine en position 393 de la séquence de la NP à la place de l'arginine présente dans la NP de LASV sauvage et n'induisant d'une faible production d'IFN de type I.

De façon intéressante, les DC et les macrophages sont activés en réponse aux double mutants LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A, comme en témoigne l'augmentation de l'expression des molécules CD40, CD80, CD86, et CD83, alors qu'ils ne le sont pas lors de l'infection par LASV sauvage ou LASV NP-R393A. Nous avons montré que, contrairement à LASV sauvage ou LASV NP-R393A, l'infection par LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A induit la synthèse des gènes codant les cytokines IL-12 et IL-15 par les DC et IL-12, IL-15 et IL-18 par les macrophages.

Nous avons observé que les cellules NK sont activées en présence de DC et de macrophages infectés par LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A. En effet, l'expression de CD69 et CD25 est augmentée à la surface des cellules NK en présence de DC infectées et de même, les macrophages infectés induisent l'augmentation de CD69, CD25 et HLA-DR. L'activation des cellules NK en réponse aux CPA infectées par LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A est concordante avec nos observations précédentes indiquant que les DC et les macrophages sont également activés lors de l'infection. De plus, nos résultats sont particulièrement intéressants car ils démontrent que d'une part, les DC infectées par LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A sont capables d'induire l'activation des cellules NK alors qu'elles ne l'étaient pas en réponse à LASV sauvage et d'autre part, ils indiquent que l'activation des cellules NK en présence de macrophages infectés par ces virus double mutants est plus forte que lors de l'infection par LASV sauvage. Il est à noter que ces LASV recombinants induisent également la diminution de l'expression de NKp30 et

NKG2D à la surface des cellules NK, ce qui a également été observé lorsque les cellules NK sont mises en présence de CPA stimulées par du LPS ou lors de la stimulation par l'IL-2/PHA.

Nous avons également observé que la transcription des ARNm codant l'IFN- γ , le TNF- α et le TNF- β était activée dans les cocultures NK/DC et NK/CPA en réponse à LASV NP-D389T/G392A et LASV NP-D389A/G392A suggérant alors que les cellules NK sont en mesure de sécréter des cytokines. Ces données pourraient, au moins en partie, s'expliquer par l'induction de la production d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-18 par les CPA lors de l'infection. En effet, le rôle de ces cytokines dans l'induction de l'IFN- γ est bien connu. Cependant, la production de ces cytokines par les cellules NK et les CPA reste à confirmer au niveau protéique. De plus, il a été montré que les DC et macrophages infectés par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A induisent une augmentation du potentiel cytotoxique des cellules NK. Nos résultats démontrent que, de façon intéressante, les cellules NK stimulées par les DC ou les macrophages infectés par les virus double mutants sont capables de lyser les cellules infectées dans les cocultures alors que ce n'est pas le cas lors de l'infection par LASV sauvage. Il serait ensuite intéressant de déterminer si ces cellules NK activées peuvent lyser les cellules infectées par LASV sauvage.

Enfin, les résultats présentés indiquent que lors de l'infection par LASV NP-D389A/G392A, le contact cellulaire entre les CPA et les cellules NK est important pour l'activation de ces dernières, illustrée par l'expression de CD69, CD25 et HLA-DR, de façon similaire à ce qui a été observé lors de l'infection par LASV sauvage. En revanche, de façon surprenante, les IFN de type I sécrétés par les DC et les macrophages infectés par ce virus double mutant ne semblent pas participer à l'activation des cellules NK alors que ces cytokines jouent un rôle important dans l'activation des cellules NK lors de l'infection par LASV. Il est à noter que les IFN de type I ne semblent pas non plus être impliqués dans l'activation des CPA en réponse à l'infection par LASV NP-D389A/G392A (données non présentées). L'infection par LASV sauvage induit peu de cytokines pro-inflammatoires *in vivo* chez les patients et les PNH et dans des modèles *in vitro* [74, 75, 78, 100, 103, 215, 226]. Ces cytokines pourraient être produites par les DC et macrophages en réponse à l'infection par LASV NP-D389A/G392A et conduire à l'activation des CPA, entraînant l'activation des cellules NK. Cette hypothèse est en cours d'investigation au laboratoire. La production de ces cytokines est en partie régulée par le facteur de transcription NF- κ B. Des travaux récents ont suggéré que les Arénavirus pathogènes inhibent l'activation de NF- κ B. En effet, il a été montré que la souche atténuée Armstrong de LCMV entraînait l'induction de NF- κ B alors que la souche virulente WE n'en était pas capable [226]. Les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A pourraient activer ce facteur de transcription, et donc la production de cytokines pro-inflammatoires conduisant alors à

l'activation des CPA et des cellules NK dans notre modèle. La confirmation de cette hypothèse requiert d'autres analyses.

Il a été montré que les nucléotides 389 et 392 de la séquence de la NP de LASV étaient impliqués dans l'inhibition de la synthèse des IFN de type I par les CPA [174]. Ces nucléotides sont situés dans le domaine exonucléasique de la NP. L'activité exonucléasique 3'-5' de la NP sur les ARN viraux pourrait empêcher la reconnaissance de ces PAMP par l'hélicase RIG-I [119, 122]. Il est suggéré que le domaine exonucléasique de la NP mutée à ces positions ne soit plus fonctionnel. La NP ainsi mutée ne serait plus capable d'empêcher la reconnaissance des ARN viraux par l'hélicase RIG-I et pourrait ainsi permettre l'induction des IFN de type I. Or, nos résultats démontrent que l'activation des cellules NK, ni celle des CPA, ne dépend pas de la réponse IFN. Ces observations suggèrent alors que la NP de LASV pourrait jouer un autre rôle que celui décrit précédemment dans l'inhibition de la production des IFN de type I. Elle pourrait ainsi être impliquée dans un mécanisme conduisant à l'activation des cellules NK, et ce indépendamment de la réponse IFN de type I. D'autres expériences sont cependant requises afin de préciser cette nouvelle fonction de la NP de LASV.

Il est à noter que les DC et macrophages infectés par les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A entrent rapidement en apoptose comme en témoigne les observations microscopiques ainsi que l'analyse de l'expression de la caspase 3 active alors que ce n'est pas le cas lors de l'infection par LASV (données non présentées). Des travaux ont montré récemment que la NP de JUNV servait de leurre et inhibait le clivage des caspases et ainsi la voie de l'apoptose [483]. Il serait possible que les mutations introduites dans la NP de LASV en positions 389 et 392 soient également situées dans un domaine important pour la régulation de l'apoptose. Les nucléotides 389 et 392 pourraient par exemple se trouver dans un site de clivage par les caspases. Les mutations dans ce domaine le rendrait non fonctionnel ce qui permettrait le clivage des caspases et l'induction de l'apoptose dans les cellules infectées par ces virus mutants. Le rôle de la NP de LASV dans l'inhibition de l'apoptose reste toutefois non connu et doit être étudié pour préciser cette hypothèse.

Les premiers travaux ont montré que les LASV recombinants NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A se répliquaient plus faiblement dans les DC et les macrophages que LASV sauvage et induisaient la sécrétion des IFN de type I [174]. De plus nous avons montré ici que les CPA étaient activées en réponse à l'infection par ces virus, entraînant l'activation des cellules NK. Tous ces résultats suggèrent fortement que ces virus sont atténués. D'autres expériences sont requises afin d'étudier les réponses T induites lors de l'infection par ces virus doubles mutants. Il serait enfin intéressant de déterminer si ces virus sont bien atténués *in vivo* chez l'animal et de plus, s'ils sont capables de conférer une protection immunitaire lors de l'infection par LASV sauvage.

Ni les cellules NK, ni les CPA ne sont activées lors de l'infection par EBOV

Les mécanismes immunitaires et la pathogenèse sont peu connus lors de l'infection par EBOV. Les cellules NK sont également déplétées du sang par un mécanisme d'apoptose chez les PNH infectés par EBOV et dans un modèle souris [299, 413, 414]. Cependant, des travaux ont montré que les réponses des cellules NK étaient importantes dans le contrôle de l'infection dans un modèle souris [423]. Les cellules NK pourraient notamment être impliquées dans le contrôle de l'infection chez les survivants. Les interactions entre les cellules NK et les CPA et leurs conséquences sur l'initiation de la réponse immune ont été peu étudiées lors de l'infection par EBOV. Nous avons ainsi analysé l'activation et les fonctions effectrices des cellules NK en réponse à EBOV mais également en présence de CPA infectées par ce virus.

Des travaux ont montré que les DC et les monocytes/macrophages étaient les premières cellules cibles d'EBOV lors de l'infection [299, 303] et que le virus ne se répliquait pas dans les populations lymphocytaires [423, 440]. Nos résultats indiquent que les cellules NK ne sont pas activées et ne prolifèrent pas au contact direct d'EBOV. La production de cytokines ou leur potentiel cytotoxique n'est pas non plus modulé. Ces résultats sont similaires à ceux observés en réponse à LASV à l'exception du récepteur CXCR3 dont l'expression est augmentée à la surface des NK en réponse à LASV mais pas à EBOV. La stimulation des cellules NK par des VLP EBOV entraîne l'activation de ces cellules, la production d'IFN- γ et de TNF- α et le contrôle de l'infection par rg-EBOV dans un modèle souris [423]. Une étude *in vitro* a également montré que les cellules NK humaines sont directement activées par des VLP EBOV comme en témoigne l'augmentation de l'expression de CD69 et NKp30 [422]. Ces cellules produisent de l'IFN- γ et du TNF- α , et sont cytotoxiques en présence de cellules K562 ou de DC infectées par EBOV. Cette étude indique cependant que les cellules NK stimulées par EBOV sauvage ne sont pas activées, comme nous l'avons observé dans notre modèle.

Les résultats présentés indiquent que les DC et les macrophages ne sont pas activés lors de l'infection par EBOV comme en témoigne l'expression des molécules impliquées dans la costimulation et la présentation de l'antigène. Nos résultats montrent que l'expression des molécules CD40, CD80, CD86, CD83 n'est pas modulée à la surface des DC infectées par EBOV et l'expression de HLA-DR semble même être diminuée. L'expression de CD40 et CD80 n'est pas modifiée à la surface des macrophages infectés par EBOV et l'expression de CD86 et HLA-DR

diminue légèrement. Nos résultats s'accordent avec les études précédentes indiquant que l'infection par EBOV conduit à une maturation défectueuse des DC. Il a été en effet montré dans des modèles *in vitro* que l'infection par EBOV n'induisait pas de maturation optimale des DC. Une étude a montré que l'expression des molécules CD86, CD80 et CD40 n'était pas modifiée lors de l'infection par EBOV [74] tandis qu'une autre a reporté que les molécules CD40 et CD80 augmentaient à la surface des DC en réponse à EBOV alors que l'expression de CD86 et HLA-DR diminuait légèrement et que l'expression de CD83 n'était pas affectée [313]. Si la maturation des DC lors de l'infection par EBOV a été bien analysée au cours d'études précédentes, nos travaux sont les premiers à détailler la modulation des molécules de costimulation et de présentation de l'antigène à la surface des macrophages infectés par EBOV. De plus, nous avons montré que l'infection de DC par EBOV n'induit pas la synthèse des gènes codant l'IFN- β , l'IFN- α_1 , l'IFN- α_2 , le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-12p35, l'IL-12p40, l'IL-15 et l'IL-18. La transcription de ces gènes n'est pas non plus activée dans les macrophages en réponse à l'infection, à l'exception de l'augmentation significative de la production des ARNm codant l'IL-1 β . Les résultats obtenus dans notre modèle sont en accord avec les études précédentes [74, 313, 314, 315]. En effet, il a été montré que les DC infectées par EBOV ne sécrètent pas d'IFN- α , de TNF- α , d'IL-1 β ou d'IL-12. Les macrophages infectés par EBOV n'induisent pas la synthèse d'IFN- α ou d'IL-12 mais sont capables de produire du TNF- α et de l'IL-1 β . Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β sont sécrétées chez les patients de façon transitoire très tôt dans l'infection par EBOV mais uniquement chez les survivants [316]. Nous n'avons pas observé de synthèse des ARNm codant le TNF- α dans les macrophages infectés par EBOV. De plus, nos résultats sont également concordants avec les analyses réalisées chez les patients révélant l'absence d'IFN- α dans le sang lors de l'infection par EBOV [321] bien que des taux élevés d'IFN de type I soient détectés chez les PNH pendant la phase aiguë [304]. Finalement, nous avons observé que l'expression des molécules de costimulation et de présentation de l'antigène ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires ne sont pas modifiées en présence des cellules NK suggérant que les cellules NK ne sont pas capables d'induire l'activation des CPA lors de l'infection par EBOV.

Les données présentées dans le cadre de cette thèse démontrent également que les cellules NK ne sont pas activées et ne prolifèrent pas en réponse aux DC infectées par EBOV. De même, les cellules NK sont faiblement activées en présence de macrophages infectés par EBOV. En effet, nous n'avons observé qu'une augmentation modérée de l'expression de CD69 ainsi qu'une diminution de NKp30 à la surface des cellules NK en présence de macrophages infectés par EBOV tandis que l'expression de HLA-DR, CD25, NKp44, NKp46, NKG2D, CXCR3 et CD62L n'était pas modulée. L'infection productive des macrophages est toutefois nécessaire à l'augmentation de l'expression de CD69 à la surface des cellules NK. L'absence d'activation des NK est concordante avec l'absence d'activation

des CPA décrite précédemment lors de l'infection par EBOV. Elle s'accorde également avec nos observations selon lesquelles l'expression de Mic-A/B, ligand de NKG2D, est diminuée à la surface des DC et des macrophages infectés par EBOV suggérant ainsi que les cellules infectées ne transmettent pas de signal activateur aux cellules NK. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de la GP à la membrane des cellules infectées masque les molécules cellulaires de surface [333]. Il est ainsi possible que la GP d'EBOV camoufle les ligands activateurs à la surface des cellules infectées et qu'ils ne puissent alors pas se lier aux récepteurs activateurs des cellules NK. Ce mécanisme permettrait ainsi d'expliquer l'absence d'activation des cellules NK en présence de DC ou de macrophages infectés.

Les cellules NK ne produisent pas d'IFN- γ en présence de DC ou macrophages infectés par EBOV. Ces résultats sont en accord avec les observations chez le macaque indiquant que l'IFN- γ n'est pas augmenté dans le sérum lors de l'infection par EBOV [304]. Chez l'homme, de forts taux d'IFN- γ sériques sont corrélés à l'issue fatale [321]. De plus, en accord avec d'autres études [74, 313], l'IL-12 n'est pas induite par les DC ou les macrophages infectés par EBOV dans notre modèle. Le rôle de l'IL-12 sur la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK est bien connu et discuté précédemment. Comme lors de l'infection par LASV, l'absence de production d'IL-12 par les DC et les macrophages infectés peut, au moins en partie, expliquer l'absence de sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK.

Le potentiel cytotoxique des cellules NK n'est pas augmenté en présence de DC ou de macrophages infectés par EBOV. En effet, l'expression des molécules GrzB et Perforine n'est pas modifiée et la lyse des cellules cibles K562 n'est pas augmentée en présence de CPA infectées par EBOV. Par ailleurs, des travaux *in vitro* ont montré que les DC infectées par EBOV sont lysées en présence de cellules NK stimulées par des VLP EBOV mais pas en présence de cellules NK non stimulées comme nous l'avons observé dans notre modèle. Les VLP comportant la VP40 et la GP d'EBOV [486] mais pas les protéines inhibitrices VP35 et VP24. En effet, des travaux ont montré que la VP40 est suffisante pour induire les réponses NK dans un modèle souris et protéger les animaux de l'infection létale par EBOV [423]. En revanche, la VP35 d'EBOV inhibe la production d'IFN de type I et les mécanismes de réponse à l'IFN [324]. La VP24 d'EBOV bloque également la voie de réponse aux IFN en inhibant la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1 [330]. La présence de ces protéines dans notre système pourrait ainsi expliquer l'inhibition des fonctions des cellules NK et l'absence de lyse des cellules infectées. Les IFN de type I ne sont pas induits par les DC et les macrophages infectés par EBOV dans ce modèle. Il serait intéressant d'étudier précisément le rôle de l'IFN dans l'activation et les fonctions des cellules NK dans notre modèle. Pour cela, des EBOV recombinants obtenus par génétique inverse et comportant des mutations dans la séquence de VP35 ou VP24 pourraient être utilisés [329, 343].

Les données présentées ici montrent qu'EBOV inactivé est capable d'induire la diminution de l'expression de NKp30, l'augmentation de l'expression de CXCR3 à la surface des cellules NK cultivées seules ainsi que l'expression intracellulaire de GrzB. De façon similaire, l'expression de CXCR3 augmente également à la surface des cellules NK en réponse à LASV inactivé. Ces observations sont reportées en présence de DC ou de macrophages stimulés par EBOV inactivé. De même, la diminution de l'expression de NKp30 et l'augmentation de l'expression de CXCR3 sont aussi observées à la surface des cellules NK en présence de macrophages stimulés par LASV inactivé. Ces résultats suggèrent que LASV et EBOV inactivés pourraient être reconnus par les PRR exprimés par les cellules NK et les CPA par un mécanisme similaire.

Conclusions

générales/perspectives

LASV et EBOV sont responsables de FH sévères en Afrique. Les mécanismes immunitaires développés lors de ces maladies et la pathogénèse restent peu connus, de par les difficultés de manipulation de ces virus en laboratoire P₄, l'absence de modèles rongeurs pertinents et la difficulté d'accès aux patients situés dans des zones difficiles d'accès. Notre équipe s'attache à développer des modèles *in vitro* afin de mieux comprendre les réponses immunitaires mises en place lors de ces FH. Nous avons développé dans le cadre de cette thèse un modèle *in vitro* permettant d'étudier les interactions entre les CPA et les cellules NK lors de l'infection par ces virus.

Lors de l'infection par LASV, les cellules NK ne s'activent pas au contact direct du virus, ni en présence de DC. La stimulation par des macrophages infectés conduit à l'activation et la prolifération des cellules NK et entraîne l'augmentation de leur potentiel cytotoxique. Les contacts cellulaires avec les macrophages ainsi que les IFN de type I et les CXC chemokines sécrétés lors de l'infection par LASV sont impliqués dans l'activation des cellules NK. Dans ces conditions, les cellules NK activées restent toutefois incapables de produire des cytokines comme l'IFN- γ , ni de lyser les macrophages infectés. Le rôle des cellules NK et les conséquences de leurs interactions avec les macrophages sont résumés dans la figure 37.

De façon surprenante, l'activation des cellules NK est similaire lors de l'infection par ces deux virus et ces cellules ne sont pas en mesure de sécréter de l'IFN- γ ou de lyser les cellules infectées. Nos résultats suggèrent alors que les cellules NK ne semblent jouer qu'un rôle mineur dans la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV car l'état d'activation des cellules NK ne semble pas différer. Cependant, ces résultats doivent être confirmés *in vivo*.

Les cellules NK s'activent fortement en réponse aux DC et aux macrophages infectés par des LASV mutants induisant de fortes réponses IFN de type I. Contrairement à l'infection par la souche sauvage de LASV, ces virus recombinants sont capables d'induire d'une part, l'activation des cellules NK en présence de DC infectées et d'autre part, l'augmentation de l'activation des cellules NK en présence de macrophages infectés. De plus, les cellules NK acquièrent des capacités cytotoxiques et sont capables de lyser les cellules infectées. De façon étonnante, les IFN de type I sécrétés par les CPA infectées ne semblent toutefois pas participer à l'activation des cellules NK alors que c'était le cas lors de l'infection par la souche sauvage de LASV.

En revanche, lors de l'infection par EBOV, ni les cellules NK, ni les DC ou les macrophages ne s'activent en réponse au virus. La costimulation des cellules NK par les DC ou des macrophages infectés ne suffit pas non plus à entraîner l'activation mutuelle de ces populations cellulaires. Les cellules NK demeurent incapables de produire des cytokines ou de lyser les cellules infectées et contrôler l'infection par EBOV. Ces résultats montrent que les cellules NK semblent également n'avoir qu'un rôle minoritaire lors de l'infection par EBOV.

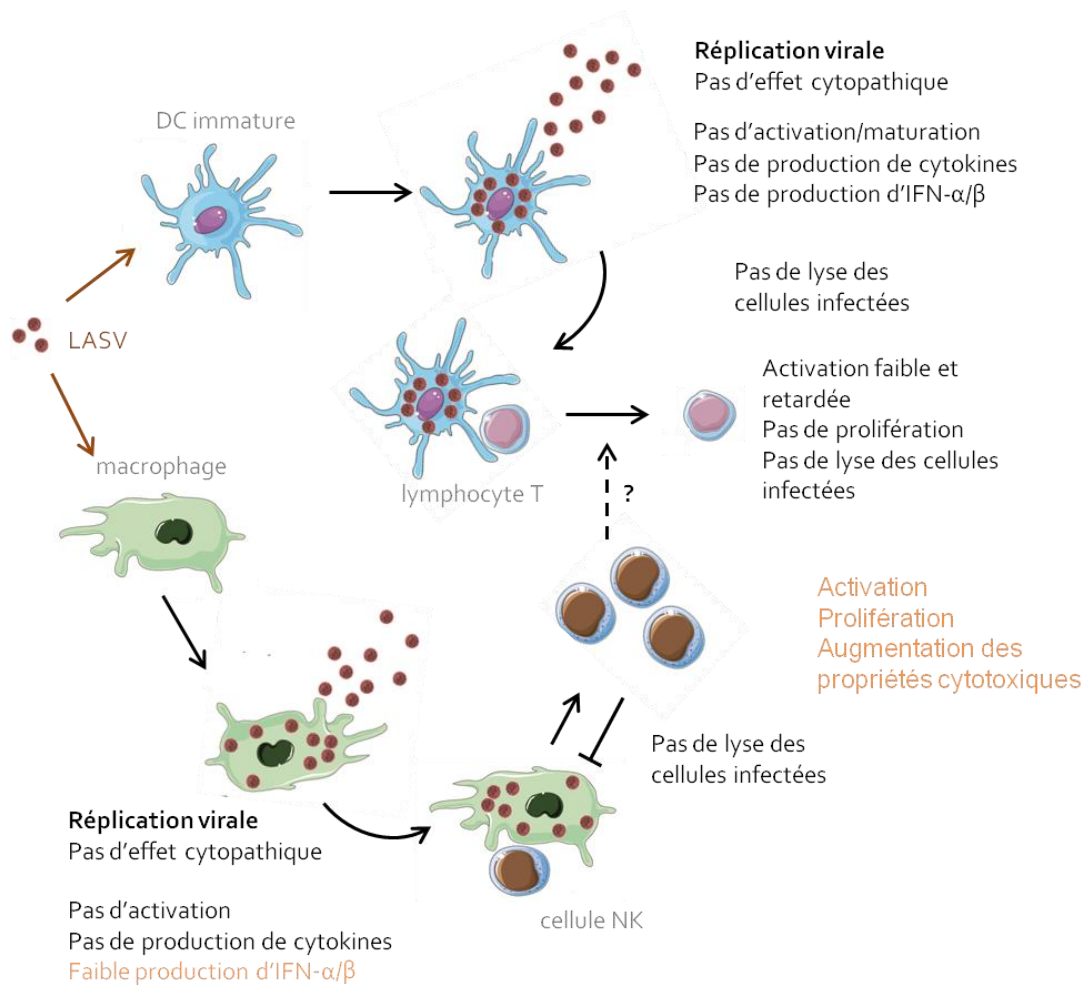


Figure 37. Modèle décrivant les réponses immunes induites lors de l'infection par LASV.

Les résultats obtenus *in vitro* dans le cadre de cette thèse ont permis de mieux comprendre le rôle des cellules NK et leurs interactions avec les CPA dans l'induction des réponses immunes induites lors des infections par LASV et EBOV, dans la pathogenèse et dans le contrôle de la réplication virale. Ils ont notamment confirmé le rôle essentiel des macrophages lors de l'infection par LASV. D'autres questions restent toutefois en suspens et des investigations sont nécessaires afin de mieux comprendre certains mécanismes probables envisagés dans le cadre de cette thèse.

⇒ *Pourquoi Les cellules NK sont-elles activées par Les macrophages en réponse à LASV ?*

Bien que les macrophages ne soient que faiblement activés lors de l'infection par LASV, ils sont capables d'activer les cellules NK. Le contact cellulaire entre les macrophages et les cellules NK ainsi que les IFN de type I et les CXC chemokines sécrétés par les macrophages sont impliqués dans l'activation des cellules NK. Ces résultats suggèrent que, bien que modérée, l'activation des macrophages pourrait permettre d'initier une boucle positive d'activation entre les macrophages et les cellules NK conduisant d'une part à la forte activation des cellules NK et d'autre part à la potentialisation de l'activation des macrophages. Des expériences in vitro sont nécessaires afin de disséquer ce mécanisme d'activation réciproque des macrophages et des cellules NK notamment en déterminant les facteurs solubles et les interactions récepteurs/ligands impliqués.

⇒ *Pourquoi Les LASV recombinants activent Les cellules NK ?*

L'activation des cellules NK est encore plus importante en présence de CPA lors de l'infection par les LASV recombinants induisant la production de fortes quantités d'IFN de type I par les cellules infectées. Cependant, ces IFN de type I ne semblent pas participer à l'activation des cellules NK. Il est donc nécessaire de déterminer les facteurs impliqués dans l'activation des CPA et des cellules NK. Il faudra donc analyser la réponse pro-inflammatoire des DC et macrophages afin de déterminer quelle voie d'activation est utilisée par les virus mutants. La voie NF- κ B est un candidat probable. Ces résultats suggèrent que la NP de LASV est probablement capable d'interférer avec d'autres voies d'activation que celles impliquées dans la réponse IFN de type I. D'autres investigations sont requises afin de disséquer le rôle de la NP et son implication dans les réponses immunes et la pathogenèse de la fièvre de Lassa. L'étude des partenaires cellulaires de la NP des Arénavirus par double hybride, actuellement initiée au laboratoire, permettra probablement de répondre à ces questions.

⇒ *Pourquoi Les cellules NK ne lysent pas Les cellules infectées Lors de L'infection par LASV ?*

De façon surprenante, les cellules NK activées en présence de macrophages infectés par LASV ne sont pas en mesure de lyser les cellules infectées. Plusieurs hypothèses pouvant être à l'origine de cette observation ont été discutées précédemment. Il est apparu, entre autres, que LASV pourrait être capable d'inhiber la mort cellulaire des cellules infectées. Cette hypothèse est en cours d'investigation au laboratoire. Des résultats prometteurs sont attendus afin de mieux comprendre les mécanismes de la mort cellulaire induite par les cellules NK et ils pourraient de plus permettre la découverte d'une nouvelle thérapeutique permettant le contrôle de l'infection virale. Par ailleurs,

lors de l'infection par les LASV recombinants, les cellules NK lysent les cellules infectées dans les cultures et elles semblent capables de contrôler l'infection virale. La comparaison de la lyse induite par les cellules NK lors des infections par LASV sauvage et par les LASV mutants peut permettre de mieux comprendre l'absence de lyse lors de l'infection par LASV. Il serait ensuite également intéressant de déterminer si les cellules NK ainsi activées par ces mutants sont en mesure de lyser des cellules infectées par la souche sauvage de LASV et ainsi de contrôler l'infection.

⇒ *Pourquoi les cellules NK ne sont pas activées lors de l'infection par EBOV ?*

Les cellules NK ne s'activent pas lors de l'infection par EBOV. La comparaison des réponses des cellules NK en réponse à EBOV avec celles mises en place lors de l'infection par RESTV, proche d'EBOV mais non pathogène, constitue une perspective intéressante afin de mieux comprendre le rôle des cellules NK dans la pathogenèse de l'infection par EBOV. Des investigations complémentaires sont également nécessaires afin de déterminer si l'absence de réponse IFN de type I permet d'expliquer l'absence d'activation des cellules NK. Des études avec des EBOV recombinants comportant des mutations dans la séquence des protéines VP35 ou VP24, impliquées dans l'inhibition des réponses IFN de type I, permettront de disséquer cette hypothèse.

⇒ *Quel est le rôle des cellules NK in vivo ?*

Enfin, des expériences in vivo restent cruciales pour confirmer les observations obtenues in vitro dans le cadre de cette thèse. Le PNH est le modèle le plus pertinent afin d'étudier la pathogenèse et les réponses immunes mises en place lors de l'infection par LASV, MOPV et EBOV. L'utilisation de ces animaux pourrait permettre de déterminer l'activation des cellules NK in vivo dans le sang circulant, sur le site de l'infection et dans les organes lymphoïdes secondaire. Les données in vivo dans un modèle PNH ou chez les patients sont requises afin de déterminer si un mécanisme d'activation réciproque entre les cellules NK et les macrophages est réellement mis en place lors de l'infection par LASV. Ces travaux permettront aussi d'étudier le rôle des cellules NK sur la mise en place et l'orientation de la réponse cellulaire T. Des investigations in vivo pourraient également permettre de mettre en évidence un éventuel rôle immunopathologique des cellules NK lors de l'infection par LASV par exemple dans l'inflammation du foie ou dans l'apparition de la surdité chez les survivants. Enfin, il serait intéressant de caractériser l'infection par les LASV doubles mutants chez l'animal et les réponses immunitaires induites. Le rôle des cellules NK lors de l'infection par EBOV dans un modèle PNH pertinent reste peu connu et des investigations in vivo chez ces animaux permettront d'analyser le statut d'activation des cellules NK et de déterminer s'il peut être corrélé avec l'issue de la maladie.

Matériels & Méthodes

⇒ *Lignées cellulaires et virus*

Les cellules VeroE6 sont des cellules épithéliales de rein de singe vert. Les cellules K562 sont des cellules humaines qui ont été isolées chez un patient ayant une leucémie myéloïde chronique. Ces deux lignées cellulaires ont été cultivées en *Dulbecco modified Eagle's medium* (DMEM) contenant 1% de pénicilline-streptomycine et 5% et 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, Life Technologies) dans un environnement à 37°C et 5% CO₂.

La souche AV de LASV a été isolée chez une patiente allemande revenant d'un voyage au Ghana, Côte d'Ivoire et Burkina Faso [22]. La souche MOPV-AN21366 a été isolée chez un rongeur de l'espèce *Mastomys natalensis* au Mozambique [207] et a été obtenue de C. Clegg et G. Lloyd (*National Collection of Pathogenic Viruses, Centre for applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Royaume Uni*). Les souches LASV recombinantes NP-R393A, NP-D389T/G392A et NP-D389A/G392A ont été obtenues par génétique inverse [174]. La technique est décrite dans la partie Introduction. La souche EBOV utilisée a été isolée lors de l'épidémie de 2001 à partir du sérum d'un patient (E. Leroy, Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Gabon).

Pour la préparation des stocks viraux, tous les virus ont été amplifiés dans des VeroE6 infectées pendant 1h à une MOI de 0,01, rincées puis cultivées en DMEM-2% SVF dans un environnement à 37°C et contenant 5% de CO₂. Le surnageant a été récolté au bout de 3-4 jours, centrifugé puis congelé à -80°C. Ce surnageant a été titré et a ainsi été utilisé en tant que stock viral après 4 et 2 passages pour LASV-AV et EBOV respectivement. De la même façon, le stock « Mock » correspond à du surnageant de VeroE6 non infectées. Les virus inactivés ont été obtenus après chauffage pendant 2h à 60°C suivi d'au moins deux cycles de congélation/décongélation.

L'absence de mycoplasme dans les lignées cellulaires et les stocks de virus a été vérifiée grâce au kit MycoAlert (Lonza) selon les instructions du fournisseur.

Toutes les expériences avec les virus LASV sauvage, LASV recombinants et EBOV ont été effectuées dans le laboratoire P₄ Jean Mérieux-Inserm, Lyon. MOPV a été manipulé en laboratoire P₂ et également dans le laboratoire P₄ lorsque les expériences le nécessitaient.

⇒ *Cellules primaires*

- *Isolation des PBMC, monocytes et PBL*

Les poches de sang provenant d'individus sains et consentants ont été obtenues de l'Etablissement Français du Sang, Lyon. Les PBMC ont été isolées par gradient de densité par centrifugation du sang total du sang total sur Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suède). Après trois

lavages, les monocytes et les PBL ont été séparés par centrifugation sur une solution de Percoll (GE Healthcare) dilué à 50% dans du *phosphate buffered saline* (PBS) (Invitrogen).

- *Purification et différenciation des monocytes*

Les monocytes ont été purifiés par sélection magnétique négative à l'aide du kit « *Monocyte Isolation* » (Miltenyi Biotech, Auburn, USA) selon les instructions du fournisseur. La pureté des monocytes a été déterminée par l'analyse de l'expression de CD14 par cytométrie en flux et elle varie entre 97 et 99,5%. Les monocytes ont ensuite été cultivés pendant 6 jours dans du milieu RPMI 1640 Glutamax I contenant 1% de pénicilline-streptomycine, 10% SVF et 10 mM d'Hepes, 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen) dans un environnement à 37°C et 5% CO₂. Du M-CSF (50 ng/ml, Miltenyi Biotech) et 10% de plasma autologue décomplémenté ont été ajoutés pour la différenciation des monocytes en macrophages et une combinaison de GM-CSF et d'IL-4 (1000 IU/ml et 500 IU/ml respectivement, Peprotech, Londres, Royaume Uni) pour obtenir des DC. Tous les deux jours, 40% du milieu de culture a été renouvelé et les cytokines remplacées.

- *Purification des cellules NK*

Les cellules NK ont été isolées à partir des PBL par sélection négative à l'aide du kit « *NK cell Isolation* » (Miltenyi Biotech). La pureté des cellules NK a été déterminée par cytométrie en flux selon l'expression des molécules CD56 et CD3. Dans nos expériences, nous avons considéré que les cellules NK étaient pures lorsque la contamination par des cellules T CD3⁺ était inférieure à 1%. Les cellules NK ont ensuite été congelées dans une solution contenant 90% de SVF et 10% de DMSO (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

⇒ *Infection des cellules et coculture NK/CPA*

Une fois différenciés, les DC et macrophages ont été récoltés et lavés pour éliminer les cytokines. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec les stocks viraux ou avec le surnageant Mock pendant 1h15 à 37°C. Après infection, les cellules ont été lavées et resuspendues à 10⁶ cellules/ml. Dans la majorité des expériences, les cellules ont été infectées à une MOI de 2.

Les cellules NK purifiées ont été décongelées, lavées et resuspendues à 10⁶ cellules/ml puis cultivées en présence de DC ou macrophages à un ratio NK/DC et NK/macrophage de 1/5.

Lors des expériences menant à analyser la répllication virale et à quantifier les particules virales dans les surnageants des cocultures, nous avons utilisé une MOI de 0,1 pour infecter les CPA et un ratio NK/CPA de 5/1.

- *Stimulation/activation des cellules primaires*

Dans certaines expériences, les DC et macrophages ont été stimulés avec du LPS (1 µg/ml, Sigma). Les cellules NK ont été activées par une combinaison de PHA (1 µg/ml) et d'IL-2 (200 IU/ml, PeproTech). L'engagement des TLR3, TLR7, TLR8 et RIG-I dans les cellules NK a été respectivement induit avec du Poly (I:C) (10 µg/ml), de l'imiquimod (15 µg/ml), du ssRNA40 (1 µg/ml) (InvivoGen, Toulouse, France).

La sécrétion de cytokines par les cellules NK a été induite par une combinaison de PMA (20 pg/ml, Sigma) et ionomycine (720 ng/ml, Sigma) ou par de l'IL-12 (50 ng/ml, PeproTech) et de l'IL-18 (50 ng/ml, MBL, Naka-ku Nagoya, Japon).

- *Inhibition des interactions cellulaires et facteurs solubles*

Dans certaines expériences, les CPA et les cellules NK ont été séparées par une membrane de polycarbonate ayant des pores de 0,4 µm, ce qui empêchait le contact entre les deux populations cellulaires mais laissait passer les facteurs solubles (Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, Pays Bas).

Dans certaines conditions, CXCR3 a été neutralisé par un anticorps monoclonal anti-CXCR3 (5 µg/ml, R&D Systems, Lille, France). Les interactions cellulaires entre les populations ont été inhibées par des anticorps neutralisants CD40L (5 µg/ml, R&D Systems), NKG2D (10 µg/ml, R&D Systems) ou par une combinaison d'anticorps dirigés contre NKp30, NKp44 et NKp46 (2 µg/ml chacun, Miltenyi Biotech). Les IFN de type I ont été neutralisés par une combinaison d'anticorps anti-IFN-α (2,5-5 µg/ml, PBL Biomedical Laboratory, Piscataway, New Jersey) et anti-CD118 (chaîne 2 d'IFNAR, 5 µg/ml, PBL). L'action des CXC chemokines a été bloquée par une combinaison d'anticorps anti-CXCL9, anti-CXCL10 et anti-CXCL11 (8 µg/ml chacun, R&D Systems). Un anticorps IgG2a (R&D Systems) a été utilisé comme anticorps contrôle.

⇒ *Titration des virus*

Des dilutions en série des stocks viraux ou des surnageants de culture ont été réalisées en DMEM-2% SVF. Des cellules VeroE6 ont été infectées par ces dilutions et incubées pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été recouvertes de 3,2% de carboxyméthyl cellulose (BDH, Poole, Royaume Uni) en PBS diluée au 1/2 dans du DMEM-5% SVF et cultivées pendant 5 à 7 jours.

Les plaques de titrage ont ensuite été révélées par immunohistochimie. Les cellules ont été fixées avec une solution de formaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température ambiante, rincées puis perméabilisées par une solution de PBS-0,5% Triton X100 (Sigma) pendant 4 minutes à température ambiante. Après rinçage, les cellules ont été marquées par des anticorps monoclonaux

anti-LASV, anti-MOPV ou anti-EBOV produits à partir d'hybridomes pendant 1h à 37°C. Pour le titrage de LASV sauvages et LASV recombinants, les anticorps utilisés sont des anti-LASV dirigés contre les protéines NP (hybridomes L52-54-6A, L52-189-13 et L52-158-3A), GP1 (hybridome L52-134-23A). Pour le titrage de MOPV, les anticorps utilisés sont un mix d'anti-MOPV dirigés contre la NP (hybridome YQBo6-AE05) et la GP2 (hybridome L53-237-5) et d'anti-LASV dirigés contre la NP (hybridome L52-54-6A). Pour le titrage d'EBOV, les anticorps utilisés sont des anti-EBOV dirigés contre les protéines GP (hybridome m-AB06-AB10), VP35 (hybridomes M-HCo1-AFo6-AE11 et Z-BCo3-BDo9), VP40 (hybridome B-mDo4-BDo7-AE11), et NP (hybridomes FB03-BE08 et Z-DD4-AE8-AA1). Ces anticorps ont été obtenus de P. Jahrling (*U.S. Army Medical Research Institute for Infectious Disease*, Fort Detrick, Maryland, USA).

Après rinçage, les cellules ont été incubées pendant 1h à 37°C dans une solution d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS. Les cellules ont ensuite été lavées et les foyers d'infection révélés par l'ajout de diaminobenzidine (Sigma). Les foyers infectieux ont été comptés et les titres infectieux calculés en FFU/ml.

⇒ *Cytométrie en flux*

- *Méthodes*

Les cellules ont été récoltées 2 à 3 jours après l'infection, lavées et les fragments FcR ont été saturés par du PBS contenant 5% de plasma autologue. Les cellules ont ensuite été marquées avec une combinaison d'anticorps de surface (décrits dans le tableau ci-dessous) pendant 30 min à 4°C. Pour analyser l'expression des molécules intracellulaires, les cellules ont été perméabilisées à l'aide du kit Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen), lavées puis incubées avec les anticorps dirigés contre les molécules intracellulaires d'intérêt. Les cellules ont finalement été fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis analysées avec les cytomètres EPICS-XL, GALLIOS (Beckman Coulter) ou Facs-Canto (BD Biosciences). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo.

- *Anticorps*

Les anticorps commerciaux utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous. Les fluorochromes auxquels ils sont couplés ainsi que les longueurs d'onde (λ) d'excitation et d'émission sont également précisées.

Fluorochrome	$\lambda_{\text{Excitation}}/$ $\lambda_{\text{Emission}}$	Laser (Excitation)	Anticorps	Fournisseur
Pacific Blue™	401/452 nm	Violet (405 nm)	CD1a	BioLegend
			CD16	BD Pharmingen
FITC	494/520	Bleu (488 nm)	CD25, HLA-abc	Beckman Coulter
			CD25, CD62L, CD80, CD86, CD107a, CD158b, GrzB, Perforine	BD Pharmingen
AlexaFluor® 488	495/519	Bleu (488 nm)	CD56	BD Pharmingen
PE	496/578	Bleu (488 nm)	CD83, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D	Beckman Coulter
			CD80, CD86, DC-Lamp, Ki67, IFN- γ , MIC-A/B, HLA-DR	BD Pharmingen
PE-Cy™ ₅	496/667	Bleu (488 nm)	CD1a	eBiosciences
			CD56, CD69, CD40, CXCR3	BD Pharmingen
AlexaFluor® 647	650/668	Rouge (633 nm)	CD56, NKp30	BD Pharmingen
PE-Cy™ ₇	496/785	Bleu (488 nm)	CD14, HLA-DR	Beckman Coulter
			CD3, CD14, CD16	BD Pharmingen
APC-H7	650/785	Rouge (633 nm)	HLA-DR	BD Pharmingen
APC-Cy7	650/785	Rouge (633 nm)	CD25	BD Pharmingen

⇒ Test de dégranulation

La cytotoxicité des cellules NK contre les cellules K562 a été évaluée après 2 jours de cocultures avec les CPA. Des cellules K562 ont été ajoutées aux cocultures à un ratio NK/K562 de 10/1 pendant 5 heures, en même temps qu'un anticorps anti-CD107a-FITC (BD Pharmingen). De la monensine (GolgiStop, PB Pharmingen) a été ajoutée aux cultures pendant les 4 dernières heures d'incubation pour empêcher la dégradation du CD107a internalisé. Les cellules ont ensuite été récoltées, marquées de façon à discriminer les populations cellulaires puis analysées par cytométrie en flux comme décrit ci-dessus.

⇒ Tests ELISpot

La sécrétion d'IFN- γ et de GrzB a été analysée avec des kits commerciaux ELISpot (BD Biosciences) selon les instructions du fabricant. Des plaques de 96 puits adaptées ont été recouvertes avec des anticorps anti-IFN- γ ou anti-GrzB la veille de l'expérience. Les cellules NK ont ensuite été mises en plaque de 96 puits (2 000 ou 10 000 cellules par puits, en triplicat) puis les CPA infectées par MOPV ou non (Mock) ont été ajoutées au ratio NK/CPA de 1/5. Du LPS ou une combinaison IL-2/PHA a été ajouté pour activer les cellules selon les conditions. Deux jours après, les molécules sécrétées ont été détectées par des anticorps monoclonaux spécifiques suivi d'une révélation

immunoenzymatique. Les spots colorés ont ensuite été visualisés au microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Allemagne) puis comptés manuellement et automatiquement à l'aide du logiciel KS ELISPOT.

⇒ Tests ELISA

Les surnageants des cocultures ont été récoltés 3 jours après l'infection et stockés à -80°C. L'expression de certaines protéines dans ces surnageants a été détectée à l'aide des kits commerciaux : IFN- α , IFN- γ , (BenderMedSystems, Vienna, Autriche), GrzB (Mabtech, Naka Strand, Suède) et CXCL11 (R&D Systems) selon les instructions des fournisseurs.

⇒ Expression des gènes

Les ARN totaux ont été extraits 24h après l'infection à partir de $6 \cdot 10^5$ cellules à l'aide du kit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Germany). L'ADN génomique a été éliminé par une étape de digestion à la DNase I (RNase-free DNase set®, Qiagen).

La RT a été effectuée avec l'ARN extrait ajouté à un mix contenant la transcriptase inverse *SuperScript III*® (100 U), un inhibiteur de RNase (*RNase out*, 12 U), le tampon *first strand* (1X), du DTT (20 mM), des amorces oligodT (0,05 μ g/ml) et un mélange de dNTP (1 mM chacun) (tous d'Invitrogen). La RT a été faite en trois étapes: dénaturation des ARNm doubles brins (10 min à 65°C), élongation des ADNc (1h à 42°C) et inactivation de la *SuperScript III*® (10 min à 65°C).

Les ADNc ont ensuite été quantifiés par PCR en temps réel (thermocycleur ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en utilisant un mix universel TaqMan® et des primers et sondes FAM™-MGB commerciales Taqman® pour les gènes IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-12p35, IL-12p40, IL-15, IL-18, CXCR3, CXCL10, FasL, TRAIL, GrzB et Perforine (Applied Biosystems). Des amorces et sondes spécifiques ont été utilisées pour l'analyse des gènes IFN- α 1 (amorces: 5'-GTGGTGCTCAGCTGCAAGTC-3' et 5'-TGTGGGTCTCAGGGAGATCAC-3', sonde : 5'-AGCTGCTCTCTGGGC-3'), IFN- α 2 (amorces: 5'-CAGTCTAGCAGCATCTGCAACAT-3' et 5'-GGAGGGCCACCAGTAAAGC-3', sonde : 5'-ACAATGGCCTTGACCTT-3') et IFN- β (amorces: 5'-TCTCCACGACAGCTCTTCCA-3' et 5'-ACACTGACAATTGCTGCTTCTTTG-3', sonde: 5'-AACTTGCTTGGATTCTT-3') [238]. Le gène GAPDH a été utilisé comme gène de référence pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt (Applied Biosystems). Les taux d'ARNm ont été calculés suivant la formule $2^{-\Delta Ct}$ où Δ *cycle threshold* (Ct) = Ct gène d'intérêt - Ct GAPDH.

⇒ *Analyse statistique des données*

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SigmaStat®. Des tests de Student (*t*-test) et des tests non paramétriques Mann-Whitney (U-test) ont été utilisés. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque $p < 0,05$.

Références

1. Buchmeier, M.J., J.-C. De la Torre, and C.J. Peteres, *Arenaviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, 5th edition, ed. D.M. Knipe and P.M. Howley. Vol. 2. 2006: Lippicott Williams & Wilkins. 3177.
2. Kunz, S., *Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus-host interaction*. Virology, 2009. **387**(2): p. 245-9.
3. Grard, G., J. Fair, D. Lee, E. Slikas, I. Steffen, J. Muyembe, T. Sittler, N. Veeraraghavan, J. Ruby, C. Wang, M. Makuwa, P. Mulembakani, R. Tesh, J. Mazet, A. Rimoin, T. Taylor, B. Schneider, G. Simmons, E. Delwart, N. Wolfe, C. Chiu, and E. Leroy, *A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa*. PLoS Pathog, 2012. **8**(9): p. e1002924.
4. Geisbert, T.W. and P.B. Jahrling, *Exotic emerging viral diseases: progress and challenges*. Nat Med, 2004. **10**(12 Suppl): p. S110-21.
5. Ergonul, O., *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries*. Curr Opin Virol, 2012. **2**(2): p. 215-20.
6. Ikegami, T. and S. Makino, *The pathogenesis of Rift Valley fever*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 493-519.
7. Macneil, A., S. Nichol, and C. Spiropoulou, *Hantavirus pulmonary syndrome*. Virus Res, 2011. **162**(1-2): p. 138-47.
8. Gubler, D., *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 480-96.
9. Gould, E. and T. Solomon, *Pathogenic flaviviruses*. Lancet, 2008. **371**(9611): p. 500-9.
10. Charrel, R. and X. De Lamballerie, *Zoonotic aspects of arenavirus infections*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 213-20.
11. Briese, T., J. Paweska, L. McMullan, S. Hutchison, C. Street, G. Palacios, M. Khristova, J. Weyer, R. Swanepoel, M. Egholm, S. Nichol, and W. Lipkin, *Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000455.
12. Paweska, J., N. Sewlall, T. Ksiazek, L. Blumberg, M. Hale, W. Lipkin, J. Weyer, S. Nichol, P. Rollin, L. McMullan, C. Paddock, T. Briese, J. Mnyaluza, T. Dinh, V. Mukonka, P. Ching, A. Duse, G. Richards, G. de Jong, C. Cohen, B. Ikalafeng, C. Mugero, C. Asomugha, M. Malotle, D. Nteo, E. Misiani, R. Swanepoel, and S. Zaki, *Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(10): p. 1598-602.
13. Parodi, A., H. Rugiero, D. Greenway, N. Mettler, A. Martinez, M. Boxaca, and J. de la Barrera, *Isolation of the Junin virus (epidemic hemorrhagic fever) from the mites of the epidemic area (Echinolaelaps echidninus, Barlese)*. Prensa Med Argent, 1959. **46**: p. 2242-4.
14. Mackenzie, R., *Epidemiology of Machupo virus infection. I. Pattern of human infection, San Joaquín, Bolivia, 1962-1964*. Am J Trop Med Hyg, 1965. **14**(5): p. 808-13.
15. Salas, R., N. de Manzione, R. Tesh, R. Rico-Hesse, R. Shope, A. Betancourt, O. Godoy, R. Bruzual, M. Pacheco, and B. Ramos, *Venezuelan haemorrhagic fever*. Lancet, 1991. **338**(8774): p. 1033-6.
16. Lisieux, T., M. Coimbra, E. Nassar, M. Burattini, L. de Souza, I. Ferreira, I. Rocco, da Rosa AP, P. Vasconcelos, and F. Pinheiro, *New arenavirus isolated in Brazil*. Lancet, 1994. **343**(8894): p. 391-2.

17. Delgado, S., B. Erickson, R. Agudo, P. Blair, E. Vallejo, C. Albariño, J. Vargas, J. Comer, P. Rollin, T. Ksiazek, J. Olson, and S. Nichol, *Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000047.
18. Fulhorst, C., M. Bowen, T. Ksiazek, P. Rollin, S. Nichol, M. Kosoy, and C. Peters, *Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus*. Virology, 1996. **224**(1): p. 114-20.
19. Rivers, T. and T. Scott, *Meningitis in man caused by a filtrable virus: II. Identification of the ethiological agent* J Exp Med, 1936. **63**(3): p. 415-32.
20. Lukashevich, I., M. Djavani, K. Shapiro, A. Sanchez, E. Ravkov, S. Nichol, and M. Salvato, *The Lassa fever virus L gene: nucleotide sequence, comparison, and precipitation of a predicted 250 kDa protein with monospecific antiserum*. J Gen Virol, 1997. **78**(Pt 3): p. 547-51.
21. Bowen, M.D., P.E. Rollin, T.G. Ksiazek, H.L. Hustad, D.G. Bausch, A.H. Demby, M.D. Bajani, C.J. Peters, and S.T. Nichol, *Genetic Diversity among Lassa Virus Strains*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6992-7004.
22. Günther, S., P. Emmerich, T. Laue, O. Kühle, M. Asper, A. Jung, T. Grewing, J. ter Meulen, and H. Schmitz, *Imported Lassa fever in Germany: molecular characterization of a new Lassa virus strain*. Emerg Infect Dis, 2000. **6**(5): p. 466-76.
23. Malherbe, H. and M. Strickland-Cholmley, *Human disease from monkeys (Marburg virus)*. Lancet, 1968. **1**(7557): p. 1434.
24. *Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team*. Bull World Health Organ, 1978. **56**(2): p. 247-70.
25. *Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976*. Bull World Health Organ, 1978. **56**(2): p. 271-93.
26. Kuhn, J., Y. Bao, S. Bavari, S. Becker, S. Bradfute, J. Brister, A. Bukreyev, K. Chandran, R. Davey, O. Dolnik, J. Dye, S. Enterlein, L. Hensley, A. Honko, P. Jahrling, K. Johnson, G. Kobinger, E. Leroy, M. Lever, E. Mühlberger, S. Netesov, G. Olinger, G. Palacios, J. Patterson, J. Paweska, L. Pitt, S. Radoshitzky, E. Saphire, S. Smither, R. Swanepoel, J. Towner, G. van der Groen, V. Volchkov, V. Wahl-Jensen, T. Warren, M. Weidmann, and S. Nichol, *Virus nomenclature below the species level: a standardized nomenclature for natural variants of viruses assigned to the family Filoviridae*. Arch Virol, 2012.
27. Negredo, A., G. Palacios, S. Vázquez-Morón, F. González, H. Dopazo, F. Molero, J. Juste, J. Quetglas, N. Savji, M. de la Cruz Martínez, J. Herrera, M. Pizarro, S. Hutchison, J. Echevarría, W. Lipkin, and A. Tenorio, *Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002304.
28. Coulibaly-N'Golo, D., B. Allali, S. Kouassi, E. Fichet-Calvet, B. Becker-Ziaja, T. Rieger, S. Olschläger, H. Dosso, C. Denys, J. Ter Meulen, C. Akoua-Koffi, and S. Günther, *Novel arenavirus sequences in Hylomyscus sp. and Mus (Nannomys) setulosus from Côte d'Ivoire: implications for evolution of arenaviruses in Africa*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20893.
29. Towner, J., T. Sealy, M. Khristova, C. Albariño, S. Conlan, S. Reeder, P. Quan, W. Lipkin, R. Downing, J. Tappero, S. Okware, J. Lutwama, B. Bakamutumaho, J. Kayiwa, J. Comer, P. Rollin, T. Ksiazek, and S. Nichol, *Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. e1000212.
30. Frame, J.D., J.M.J. Baldwin, D.J. Gocke, and J.M. Troup, *Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings*. Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(4): p. 670-6.
31. Buckley, S.M. and J. Casals, *Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. III. Isolation and characterization of the virus*. Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(4): p. 680-91.

32. Leifer, E., D.J. Gocke, and H. Bourne, *Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. II. Report of a laboratory-acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease.* Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(4): p. 677-9.
33. Troup, J., H. White, A. Fom, and D. Carey, *An outbreak of Lassa fever on the Jos plateau, Nigeria, in January-February 1970. A preliminary report.* Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(4): p. 695-6.
34. Carey, D., G. Kemp, H. White, L. Pinneo, R. Addy, A. Fom, G. Stroh, J. Casals, and B. Henderson, *Lassa fever. Epidemiological aspects of the 1970 epidemic, Jos, Nigeria.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1972. **66**(3): p. 402-8.
35. White, H., *Lassa fever. A study of 23 hospital cases.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 1972. **66**(3): p. 390-401.
36. Gilles, H. and J. Kent, *Lassa fever: retrospective diagnosis of two patients seen in Great Britain in 1971.* Br Med J, 1976. **2**(6045): p. 1173.
37. Fraser, D., C. Campbell, T. Monath, P. Goff, and M. Gregg, *Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. I. Epidemiologic studies.* Am J Trop Med Hyg, 1974. **23**(6): p. 1131-9.
38. Monath, T., M. Maher, J. Casals, R. Kissling, and A. Cacciapuoti, *Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases.* Am J Trop Med Hyg, 1974. **23**(6): p. 1140-9.
39. Monath, T., V. Newhouse, G. Kemp, H. Setzer, and A. Cacciapuoti, *Lassa virus isolation from Mastomys natalensis rodents during an epidemic in Sierra Leone.* Science, 1974. **185**(4147): p. 263-5.
40. Monath, T., P. Mertens, R. Patton, C. Moser, J. Baum, L. Pinneo, G. Gary, and R. Kissling, *A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972.* Am J Trop Med Hyg, 1973. **22**(6): p. 773-9.
41. Bowen, G., O. Tomori, H. Wulff, J. Casals, A. Noonan, and W. Downs, *Lassa fever in Onitsha, East Central State, Nigeria in 1974.* Bull World Health Organ, 1975. **52**(4-6): p. 599-604.
42. WHO, *Update on Lassa fever in West Africa.* Wkly Epidemiol Rec, 2005. **80**(10): p. 85-92.
43. Omilabu, S., S. Badaru, P. Okokhere, D. Asogun, C. Drosten, P. Emmerich, B. Becker-Ziaja, H. Schmitz, and S. Günther, *Lassa fever, Nigeria, 2003 and 2004.* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(10): p. 1642-4.
44. Monath, T., *Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology.* Bull World Health Organ, 1975. **52**(4-6): p. 577-92.
45. Zweighaft, R., D. Fraser, M. Hattwick, W. Winkler, W. Jordan, M. Alter, M. Wolfe, H. Wulff, and K. Johnson, *Lassa fever: response to an imported case.* N Eng J Med, 1977. **297**(15): p. 803-7.
46. Emond, R., B. Bannister, G. Lloyd, T. Southee, and E. Bowen, *A case of Lassa fever: clinical and virological findings.* Br Med J (Clin Res Ed), 1982. **285**(6347): p. 1001-2.
47. Macher, A. and M. Wolfe, *Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update.* Emerg Infect Dis, 2006. **12**(5): p. 835-7.
48. Beeching, N., T. Fletcher, D. Hill, and G. Thomson, *Travellers and viral haemorrhagic fevers: what are the risks?* Int J Antimicrob Agents, 2010. **36**(Suppl 1): p. S36-5.
49. Schmitz, H., B. Köhler, T. Laue, C. Drosten, P. Veldkamp, S. Günther, P. Emmerich, H. Geisen, K. Fleischer, M. Beersma, and A. Hoerauf, *Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever.* Microbes Infect, 2002. **4**(1): p. 43-50.

50. Atkin, S., S. Anaraki, P. Gothard, A. Walsh, D. Brown, R. Gopal, J. Hand, and D. Morgan, *The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009*. Euro Surveill, 2009. **14**(10): p. 19145.
51. Safronetz, D., J. Lopez, N. Sogoba, S. Traore', S. Raffel, E. Fischer, H. Ebihara, L. Branco, R. Garry, T. Schwan, and H. Feldmann, *Detection of Lassa virus, Mali*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(7): p. 1123-6.
52. Stephenson, E., E. Larson, and J. Dominik, *Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection*. J Med Virol, 1984. **14**(4): p. 295-303.
53. Fisher-Hoch, S., O. Tomori, A. Nasidi, G. Perez-Oronoz, Y. Fakile, L. Hutwagner, and J. McCormick, *Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice*. BMJ, 1995. **311**(7009): p. 857-9.
54. Price, M., S. Fisher-Hoch, R. Craven, and J. McCormick, *A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy*. BMJ, 1988. **297**(6648): p. 584-7.
55. McCormick, J., P. Webb, J. Krebs, K. Johnson, and E. Smith, *A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever*. J Infect Dis, 1987. **155**: p. 437-44.
56. Ter Meulen, J., I. Lukashovich, K. Sidibe, A. Inapogui, M. Marx, A. Dorlemann, M. Yansane, K. Koulemou, J. Chang-Claude, and H. Schmitz, *Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **55**(6): p. 661-6.
57. Fichet-Calvet, E., E. Lecompte, L. Koivogui, B. Soropogui, A. Doré, F. Kourouma, O. Sylla, S. Daffis, K. Koulemou, and J. Ter Meulen, *Fluctuation of abundance and Lassa virus prevalence in Mastomys natalensis in Guinea, West Africa*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2007. **7**(2): p. 119-28.
58. Fichet-Calvet, E. and D.J. Rogers, *Risk maps of Lassa fever in west africa*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(3): p. e388.
59. Lalis, A., R. Leblois, E. Lecompte, C. Denys, J. Ter Meulen, and T. Wirth, *The impact of human conflict on the genetics of Mastomys natalensis and Lassa virus in West Africa*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37068.
60. Frame, J., *Surveillance of Lassa fever in missionaries stationed in West Africa*. Bull World Health Organ, 1975. **52**(4-6): p. 593-8.
61. Saluzzo, J., F. Adam, J. McCormick, and J. Digoutte, *Lassa fever virus in Senegal*. J Infect Dis, 1988. **157**(3): p. 605.
62. Lukashovich, I., J. Clegg, and K. Sidibe, *Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen*. J Med Virol, 1993. **40**(3): p. 210-7.
63. Johnson, B., D. Ocheng, A. Gichogo, M. Okiro, D. Libondo, P. Tukei, M. Ho, M. Mugambi, G. Timms, and M. French, *Antibodies against haemorrhagic fever viruses in Kenya populations*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1983. **77**(5): p. 731-3.
64. Ivanoff, B., P. Duquesnoy, G. Languillat, J. Saluzzo, A. Georges, J. Gonzalez, and J. McCormick, *Haemorrhagic fever in Gabon. I. Incidence of Lassa, Ebola and Marburg viruses in Haut-Ogooué*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1982. **76**(6): p. 719-20.
65. Gonzalez, J., R. Josse, E. Johnson, M. Merlin, A. Georges, J. Abandja, M. Danyod, E. Delaporte, A. Dupont, and e.a. Ghogomu A, *Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative Central African populations*. Res Virol, 1989. **140**(4): p. 319-31.
66. Drosten, C., B. Kümmerer, H. Schmitz, and S. Günther, *Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers*. Antiviral Res, 2003. **57**(1-2): p. 61-87.

67. Jahrling, P., B. Niklasson, and J. McCormick, *Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody*. *Lancet*, 1985. **1**(8423): p. 250-2.
68. Ter Meulen, J., K. Koulemou, T. Wittekindt, K. Windisch, S. Strigl, S. Conde, and H. Schmitz, *Detection of Lassa virus antinucleoprotein immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies by a simple recombinant immunoblot assay for field use*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(11): p. 3143-8.
69. Johnson, K., J. McCormick, P. Webb, E. Smith, L. Elliott, and I. King, *Clinical virology of lassa fever in hospitalized patients*. *J Infect Dis*, 1987. **155**: p. 456-64.
70. Günther, S., B. Weisner, A. Roth, T. Grewing, M. Asper, C. Drosten, P. Emmerich, J. Petersen, M. Wilczek, and H. Schmitz, *Lassa fever encephalopathy: Lassa virus in cerebrospinal fluid but not in serum*. *J Infect Dis*, 2001. **184**(3): p. 345-9.
71. Demby, A., J. Chamberlain, D. Brown, and C. Clegg, *Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR*. *J Clin Microbiol*, 1994. **32**(12): p. 2898-903.
72. Drosten, C., S. Göttig, S. Schilling, M. Asper, M. Panning, H. Schmitz, and S. Günther, *Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR*. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(7): p. 2323-30.
73. Edington, G. and H. White, *The pathology of Lassa fever*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1972. **66**(3): p. 381-9.
74. Mahanty, S., K. Hutchinson, S. Agarwal, M. McRae, P.E. Rollin, and B. Pulendran, *Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 2797-801.
75. Baize, S., J. Kaplon, C. Faure, D. Pannetier, M.-C. Georges-Courbot, and V. Deubel, *Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2861-9.
76. Winn, W.J. and D. Walker, *The pathology of human Lassa fever*. *Bull World Health Organ*, 1975. **52**(4-6): p. 535-46.
77. Walker, D., J. McCormick, C. Johnson, P. Webb, G. Komba-Kono, L. Elliott, and J. Gardner, *Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man*. *Am J Pathol*, 1982. **107**(3): p. 349-56.
78. Mahanty, S., D. Bausch, R. Thomas, A. Goba, A. Bah, C. Peters, and P. Rollin, *Low levels of interleukin-8 and interferon-inducible protein-10 in serum are associated with fatal infections in acute Lassa fever*. *J Infect Dis*, 2001. **183**(12): p. 1713-21.
79. McCormick, J., D. Walker, I. King, P. Webb, L. Elliott, S. Whitfield, and K. Johnson, *Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans*. *Am J Trop Med Hyg*, 1986. **35**(2): p. 401-7.
80. Cummins, D., S. Fisher-Hoch, K. Walshe, I. Mackie, J. McCormick, D. Bennett, G. Perez, B. Farrar, and S. Machin, *A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Lassa fever*. *Br J Haematol*, 1989. **72**(4): p. 543-8.
81. Fisher-Hoch, S., J. McCormick, D. Sasso, and R. Craven, *Hematologic dysfunction in Lassa fever*. *J Med Virol*, 1988. **26**(2): p. 127-35.
82. Okokhere, P., T. Ibekwe, and G. Akpede, *Sensorineural hearing loss in Lassa fever: two case reports*. *J Med Case Rep*, 2009. **3**(36): p. 1-3.
83. Rambukkana, A., S. Kunz, J. Min, K. Campbell, and M. Oldstone, *Targeting Schwann cells by nonlytic arenaviral infection selectively inhibits myelination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(26): p. 16071-6.

84. Cummins, D., J. McCormick, D. Bennett, J. Samba, B. Farrar, S. Machin, and F.-H. SP, *Acute sensorineural deafness in Lassa fever*. JAMA, 1990. **264**: p. 2093-6.
85. Jahrling, P.B., R.A. Hesse, J.B. Rhoderick, M. Elwell, and J. Moe, *Pathogenesis of a pichinde virus strain adapted to produce lethal infections in guinea pigs*. Infect Immun, 1981. **32**(2): p. 872-80.
86. Jahrling, P.B., S. Smith, R.A. Hesse, and J.B. Rhoderick, *Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs*. Infect Immun, 1982. **37**(2): p. 771-8.
87. Lukashevich, I.S., J. Patterson, R. Carrion, D. Moshkoff, A. Ticer, J. Zapata, K. Brasky, R. Geiger, G.B. Hubbard, J. Bryant, and M.S. Salvato, *A live attenuated vaccine for lassa fever made by reassortment of lassa and mopeia viruses*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 13934-42.
88. Sbrana, E., R. Mateo, S. Xiao, V. Popov, P. Newman, and R. Tesh, *Clinical laboratory, virologic, and pathologic changes in hamsters experimentally infected with Pirital virus (Arenaviridae): a rodent model of Lassa fever*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(6): p. 1096-102.
89. Flatz, L., T. Rieger, D. Merkler, A. Bergthaler, T. Regen, M. Schedensack, L. Bestmann, A. Verschoor, M. Kreutzfeldt, W. Brück, U. Hanisch, S. Günther, and D. Pinschewer, *T cell-dependence of Lassa fever pathogenesis*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000836.
90. Yun, N., A. Poussard, A. Seregin, A. Walker, J. Smith, J. Aronson, J. Smith, L. Soong, and S. Paessler, *Functional interferon system is required for clearance of lassa virus*. J Virol, 2012. **86**(6): p. 3389-92.
91. Kolokoltsova, O., N. Yun, A. Poussard, J. Smith, J. Smith, M. Salazar, A. Walker, C. Tseng, J. Aronson, and S. Paessler, *Mice lacking alpha/beta and gamma interferon receptors are susceptible to junin virus infection*. J Virol, 2010. **84**(24): p. 13063-7.
92. Zapata, J., C. Pauza, M. Djavani, J. Rodas, D. Moshkoff, J. Bryant, E. Ateh, C. Garcia, I. Lukashevich, and M. Salvato, *Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of macaques: a model for Lassa fever*. Antiviral Res, 2011. **92**(2): p. 125-38.
93. Johnson, R., L. Dodd, S. Yellayi, W. Gu, J. Cann, C. Jett, J. Bernbaum, D. Ragland, M. St Claire, R. Byrum, J. Paragas, J. Blaney, and P. Jahrling, *Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease*. Virology, 2011. **421**(2): p. 129-40.
94. Walker, D., H. Wulff, and F. Murphy, *Experimental Lassa virus infection in the squirrel monkey*. Am J Pathol, 1975. **80**(2): p. 261-78.
95. Carrion, R., Jr., K. Brasky, K. Mansfield, C. Johnson, M. Gonzales, A. Ticer, I. Lukashevich, S. Tardif, and J. Patterson, *Lassa Virus Infection in Experimentally Infected Marmosets: Liver Pathology and Immunophenotypic Alterations in Target Tissues*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6482-90.
96. Stephen, E. and P.B. Jahrling, *Experimental Lassa fever virus infection successfully treated with ribavirin*. Lancet, 1979. **1**(8110): p. 268-9.
97. Kiley, M., J. Lange, and K. Johnson, *Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related Arenavirus*. Lancet, 1979. **2**: p. 738-45.
98. Jahrling, P., C. Peters, and E. Stephen, *Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys*. J Infect Dis, 1984. **149**(3): p. 420-7.
99. Jahrling, P.B., R.A. Hesse, G. Eddy, K. Johnson, R.T. Callis, and E. Stephen, *Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin*. J Infect Dis, 1980. **141**(5): p. 580-9.

100. Baize, S., P. Marianneau, P. Loth, S. Reynard, A. Journeaux, M. Chevallier, N. Tordo, V. Deubel, and H. Contamin, *Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in Lassa virus-infected cynomolgus monkeys*. J Virol, 2009. **83**(11): p. 5890-903.
101. Callis, R.T., P.B. Jahrling, and A. DePaoli, *Pathology of Lassa Virus Infection in the Rhesus Monkey*. Am J Trop Med Hyg, 1982. **31**(5): p. 1038-45.
102. Fisher-Hoch, S., S. Mitchell, D. Sasso, J. Lange, R. Ramsey, and J. McCormick, *Physiological and immunologic disturbances associated with shock in a primate model of Lassa fever*. J Infect Dis, 1987. **155**(3): p. 465-74.
103. Hensley, L., M. Smith, J. Geisbert, E. Fritz, K. Daddario-DiCaprio, T. Larsen, and T. Geisbert, *Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques*. Virol J, 2011. **8**(205): p. 1-15.
104. Lange, J., S. Mitchell, J. McCormick, D. Walker, B. Evatt, and R. Ramsey, *Kinetic study of platelets and fibrinogen in Lassa virus-infected monkeys and early pathologic events in Mopeia virus-infected monkeys*. Am J Trop Med Hyg, 1985. **34**(5): p. 999-1007.
105. Lukashevich, I., J. Rodas, I. Tikhonov, J. Zapata, Y. Yang, M. Djavani, and M. Salvato, *LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration*. Arch Virol, 2004. **149**(12): p. 2319-36.
106. Rodas, J., I. Lukashevich, J. Zapata, C. Cairo, I. Tikhonov, M. Djavani, C. Pauza, and M. Salvato, *Mucosal arenavirus infection of primates can protect them from lethal hemorrhagic fever*. J Med Virol, 2004. **72**(3): p. 424-35.
107. Lukashevich, I., I. Tikhonov, J. Rodas, J. Zapata, Y. Yang, M. Djavani, and M. Salvato, *Arenavirus-mediated liver pathology: acute lymphocytic choriomeningitis virus infection of rhesus macaques is characterized by high-level interleukin-6 expression and hepatocyte proliferation*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 1727-37.
108. Lukashevich, I., M. Djavani, J. Rodas, J. Zapata, A. Osborne, C. Emerson, J. Mitchen, P. Jahrling, and M. Salvato, *Hemorrhagic fever occurs after intravenous, but not after intragastric, inoculation of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus*. J Med Virol, 2002. **67**(2): p. 171-86.
109. Djavani, M., O. Crasta, Y. Zhang, J. Zapata, B. Sobral, M. Lechner, J. Bryant, H. Davis, and M. Salvato, *Gene expression in primate liver during viral hemorrhagic fever*. Virol J, 2009. **6**(20): p. 1-18.
110. Murphy, F., *Arenavirus taxonomy: a review*. Bull World Health Organ, 1975. **52**(4-6): p. 389-91.
111. Speir, R., O. Wood, H. Liebhaver, and S.M. Buckley, *Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus*. Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(4): p. 692-4.
112. Murphy, F. and S. Whitfield, *Morphology and morphogenesis of arenaviruses*. Bull World Health Organ, 1975. **52**(4-6): p. 409-19.
113. Lukashevich, I.S., T. Stelmakh, V. Golubev, E. Stchesljenok, and N. Lemeshko, *Ribonucleic acids of Machupo and Lassa viruses*. Arch 1984. **79**(3-4): p. 189-203.
114. Auperin, D., D. Sasso, and J. McCormick, *Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA*. Virology, 1986. **154**(1): p. 155-67.
115. Auperin, D. and J. McCormick, *Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and amino acid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses*. Virology, 1989. **168**(2): p. 421-5.
116. Hass, M., M. Westerkofsky, S. Müller, B. Becker-Ziaja, C. Busch, and S. Günther, *Mutational analysis of the lassa virus promoter*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12414-9.

117. Ortiz-Riaño, E., B. Cheng, J. de la Torre, and L. Martínez-Sobrido, *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, 2012. **86**(6): p. 3307-17.
118. Hastie, K., T. Liu, S. Li, L. King, N. Ngo, M. Zandonatti, J. Woods VL, J. de la Torre, and E. Saphire, *Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(48): p. 19365-70.
119. Qi, X., S. Lan, W. Wang, L. Schelde, H. Dong, G. Wallat, H. Ly, Y. Liang, and C. Dong, *Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 779-83.
120. Shtanko, O., M. Imai, H. Goto, I. Lukashevich, G. Neumann, T. Watanabe, and Y. Kawaoka, *A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles*. J Virol, 2010. **84**(10): p. 5415-22.
121. Ortiz-Riaño, E., B. Cheng, J. de la Torre, and L. Martínez-Sobrido, *The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13038-48.
122. Hastie, K., C. Kimberlin, M. Zandonatti, I. Macrae, and E. Saphire, *Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2396-401.
123. Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H. Klenk, and W. Garten, *Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 12293-9.
124. Messina, E., J. York, and J. Nunberg, *Dissection of the role of the stable signal peptide of the arenavirus envelope glycoprotein in membrane fusion*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6138-45.
125. Schlie, K., T. Strecker, and W. Garten, *Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail*. FEBS Lett, 2010. **584**(21): p. 4379-82.
126. Schlie, K., A. Maisa, F. Lennartz, U. Ströher, W. Garten, and T. Strecker, *Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 983-92.
127. Glushakova, S., V. Omelyanenko, I. Lukashevitch, A.J. Bogdanov, A. Moshnikova, A. Kozytch, and V. Torchilin, *The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide'*. Biophys Biochim Acta, 1992. **1110**(2): p. 202-8.
128. Klewitz, C., H. Klenk, and J. ter Meulen, *Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt8): p. 2320-8.
129. Gallaher, W., C. DiSimone, and M. Buchmeier, *The viral transmembrane superfamily: possible divergence of Arenavirus and Filovirus glycoproteins from a common RNA virus ancestor*. BMC Microbiol, 2001. **1**(1): p. 1-6.
130. Lenz, O., J. Ter Meulen, H. Feldmann, H. Klenk, and W. Garten, *Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 11418-21.
131. Lenz, O., J. Ter Meulen, H. Klenk, N. Seidah, and W. Garten, *The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(22): p. 12701-5.
132. Burri, D., G. Pasqual, C. Rochat, N. Seidah, A. Pasquato, and S. Kunz, *Molecular characterization of the processing of arenavirus envelope glycoprotein precursors by subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 4935-46.

133. Illick, M., L. Branco, J. Fair, K. Illick, A. Matschiner, R. Schoepp, R. Garry, and M. Guttieri, *Uncoupling GP1 and GP2 expression in the Lassa virus glycoprotein complex: implications for GP1 ectodomain shedding*. *Virology*, 2008. **5**(161): p. 1-17.
134. Branco, L. and R. Garry, *Characterization of the Lassa virus GP1 ectodomain shedding: implications for improved diagnostic platforms*. *Virology*, 2009. **6**(147): p. 1-17.
135. Branco, L., J. Grove, L. Moses, A. Goba, M. Fullah, M. Momoh, R. Schoepp, D. Bausch, and R. Garry, *Shedding of soluble glycoprotein 1 detected during acute Lassa virus infection in human subjects*. *Virology*, 2010. **7**(306): p. 1-11.
136. Brunotte, L., M. Lelke, M. Hass, K. Kleinstueber, B. Becker-Ziaja, and S. Günther, *Domain structure of Lassa virus L protein*. *J Virol*, 2011. **85**(1): p. 324-33.
137. Hass, M., M. Lelke, C. Busch, B. Becker-Ziaja, and S. Günther, *Mutational evidence for a structural model of the Lassa virus RNA polymerase domain and identification of two residues, Gly1394 and Asp1395, that are critical for transcription but not replication of the genome*. *J Virol*, 2008. **82**(20): p. 10207-17.
138. Lelke, M., M. Brunotte, C. Busch, and S. Günther, *An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome*. *J Virol*, 2010. **84**(4): p. 1934-44.
139. Djavani, M., I. Lukashevich, A. Sanchez, S. Nichol, and M.S. Salvato, *Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End*. *Virology*, 1997. **235**(2): p. 414-8.
140. Strecker, T., R. Eichler, J. ter Meulen, W. Weissenhorn, H. Klenk, W. Garten, and O. Lenz, *Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles* *J Virol*, 2003. **77**(19): p. 10700-5.
141. Capul, A., J. de la Torre, and M. Buchmeier, *Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein*. *J Virol*, 2011. **85**(7): p. 3172-8.
142. Perez, M., D. Greenwald, and J. De la Torre, *Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding*. *J Virol*, 2004. **78**(20): p. 11443-8.
143. Strecker, T., A. Maisa, S. Daffis, R. Eichler, O. Lenz, and W. Garten, *The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z*. *Virology*, 2006. **3**(93): p. 1-10.
144. Capul, A., M. Perez, E. Burke, S. Kunz, M.J. Buchmeier, and J. de la Torre, *Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains*. *J Virol*, 2007. **81**(17): p. 9451-60.
145. Perez, M., R. Craven, and J. De la Torre, *The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(22): p. 12978-83.
146. Urata, S., T. Noda, Y. Kawaoka, H. Yokosawa, and J. Yasuda, *Cellular factors required for Lassa virus budding*. *J Virol*, 2006. **80**(8): p. 4191-5.
147. Shtanko, O., S. Watanabe, L. Jasenosky, T. Watanabe, and Y. Kawaoka, *ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles*. *J Virol*, 2011. **85**(7): p. 3631-41.
148. Eichler, R., T. Strecker, L. Kolesnikova, J. ter Meulen, W. Weissenhorn, S. Becker, H. Klenk, W. Garten, and O. Lenz, *Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP)*. *Virus Res*, 2004. **100**(2): p. 249-55.
149. Cornu, T. and J. de la Torre, *RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome*. *J Virol*, 2001. **75**(19): p. 9415-26.
150. Cornu, T., H. Feldmann, and D.I.T. JC, *Cells expressing the RING finger Z protein are resistant to arenavirus infection*. *J Virol*, 2004. **78**(6): p. 2979-83.

151. Garcin, D., S. Rochat, and D. Kolakofsky, *The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 807-12.
152. Jácamo, R., N. López, M. Wilda, and M. Franze-Fernández, *Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis*. J Virol, 2001. **77**(19): p. 10383-93.
153. Campbell Dwyer, E., H. Lai, R. MacDonald, M. Salvato, and K. Borden, *The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3293-300.
154. Kentsis, A., E. Campbell Dwyer, J. Perez, M. Sharma, A. Chen, Z. Pan, and K. Borden, *The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E*. J Mol Biol, 2001. **312**(4): p. 609-23.
155. Borden, K.L.B., E.J. Campbell Dwyer, and M.S. Salvato, *An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein Promyelocytic Leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 758-66.
156. Cao, W., M.D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J.H. Elder, E.V. Ravkov, S.T. Nichol, R.W. Compans, K.P. Campbell, and M.B. Oldstone, *Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2079-81.
157. Imperiali, M., C. Thoma, E. Pavoni, A. Brancaccio, N. Callewaert, and A. Oxenius, *O Mannosylation of alpha-dystroglycan is essential for lymphocytic choriomeningitis virus receptor function*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14297-308.
158. Kunz, S., J. Rojek, M. Kanagawa, C. Spiropoulou, R. Barresi, K. Campbell, and M. Oldstone, *Posttranslational modification of alpha-dystroglycan, the cellular receptor for arenaviruses, by the glycosyltransferase LARGE is critical for virus binding*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14282-96.
159. Rojek, J., C. Spiropoulou, K. Campbell, and S. Kunz, *Old World and clade C New World arenaviruses mimic the molecular mechanism of receptor recognition used by alpha-dystroglycan's host-derived ligands*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5885-95.
160. Rojek, J.M., K.P. Campbell, M.B.A. Oldstone, and S. Kunz, *Old World arenavirus infection interferes with the expression of functional alpha-dystroglycan in the host cell*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(11): p. 4493-507.
161. Shimojima, M., U. Ströher, H. Ebihara, H. Feldmann, and Y. Kawaoka, *Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry*. J Virol, 2012. **86**(4): p. 2067-78.
162. Radoshitzky, S., J. Abraham, C. Spiropoulou, J. Kuhn, D. Nguyen, W. Li, J. Nagel, P. Schmidt, J. Nunberg, N. Andrews, M. Farzan, and H. Choe, *Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses*. Nature, 2007. **446**(7131): p. 92-6.
163. Rojek, J.M. and S. Kunz, *Cell entry by human pathogenic arenaviruses*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 828-35.
164. Nunberg, J. and J. York, *The curious case of arenavirus entry, and its inhibition*. Viruses, 2012. **4**(1): p. 83-101.
165. Vela, E., L. Zhang, T. Colpitts, R. Davey, and J. Aronson, *Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism*. Virology, 2007. **369**(1): p. 1-11.
166. Rojek, J., A. Sanchez, N. Nguyen, J. de la Torre, and S. Kunz, *Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7677-87.
167. Quirin, K., B. Eschli, I. Scheu, L. Poort, J. Kartenbeck, and A. Helenius, *Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes*. Virology, 2008. **378**(1): p. 21-33.

168. Pasqual, G., J. Rojek, M. Masin, J. Chatton, and S. Kunz, *Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002232.
169. Cosset, F., P. Marianneau, G. Verney, F. Gallais, N. Tordo, E. Pécheur, J. Ter Meulen, V. Deubel, and B. Bartosch, *Characterization of Lassa virus cell entry and neutralization with Lassa virus pseudoparticles*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3228-37.
170. Lukashevich, I., *Generation of reassortants between African arenaviruses*. Virology, 1992. **188**(2): p. 600-5.
171. Emonet, S., S. Urata, and D.I.T. JC, *Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies*. Virology, 2011. **411**(2): p. 416-25.
172. Pinschewer, D., M. Perez, A. Sanchez, and J. de la Torre, *Recombinant lymphocytic choriomeningitis virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7895-900.
173. Albariño, C., B. Bird, A. Chakrabarti, K. Dodd, B. Erickson, and S. Nichol, *Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence*. J Virol, 2011. **85**(8): p. 4020-4.
174. Carnec, X., S. Baize, S. Reynard, L. Diancourt, V. Caro, N. Tordo, and M. Bouloy, *Lassa virus nucleoprotein mutants generated by reverse genetics induce robust type I IFN response in human dendritic cells and macrophages*. J Virol, 2011. **85**(22): p. 12093-7.
175. Gaudiard, N., A. Billecocq, R. Flick, and M. Bouloy, *Rift Valley fever virus noncoding regions of L, M and S segments regulate RNA synthesis*. Virology, 2006. **251**(1): p. 170-9.
176. Flick, R. and R. Pettersson, *Reverse genetics system for Uukuniemi virus (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1643-55.
177. Hass, M., U. Gölnitz, S. Müller, B. Becker-Ziaja, and S. Günther, *Replicon system for Lassa virus*. J Virol, 2004. **78**(24): p. 13793-803.
178. Pinschewer, D., M. Perez, and J. de la Torre, *Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4519-26.
179. McCormick, J., I. King, P. Webb, C. Scribner, R. Craven, K. Johnson, L. Elliott, and R. Belmont-Williams, *Lassa fever: effective therapy with ribavirin*. N Eng J Med, 1986. **314**: p. 20-6.
180. Gowen, B., D. Smee, M. Wong, A. Pace, K. Jung, K. Bailey, L. Blatt, and R. Sidwell, *Combinatorial ribavirin and interferon alfacon-1 therapy of acute arenaviral disease in hamsters*. Antivir Chem Chemother, 2006. **17**(4): p. 175-83.
181. Snell, N., *Ribavirin--current status of a broad spectrum antiviral agent*. Expert Opin Pharmacother, 2001. **2**(8): p. 1317-24.
182. Ölschläger, S., J. Neyts, and S. Günther, *Depletion of GTP pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on Lassa virus*. Antiviral Res, 2011. **91**(2): p. 89-93.
183. Crotty, S., C. Cameron, and R. Andino, *Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis?* J Mol Med (Berl), 2002. **80**(2): p. 86-95.
184. Uckun, F., A. Petkevich, A. Vassilev, H. Tibbles, and L. Titov, *Stampidine prevents mortality in an experimental mouse model of viral hemorrhagic fever caused by lassa virus*. BMC Infect Dis, 2004. **4**(1): p. 1-7.

185. Uckun, F., T. Venkatachalam, D. Erbeck, C. Chen, A. Petkevich, and A. Vassilev, *Zidampidine, an aryl phosphate derivative of AZT: in vivo pharmacokinetics, metabolism, toxicity, and anti-viral efficacy against hemorrhagic fever caused by Lassa virus*. *Bioorg Med Chem*, 2005. **13**(9): p. 3279-88.
186. Kunz, S., L. Calder, and M. Oldstone, *Electron microscopy of an alpha-dystroglycan fragment containing receptor sites for lymphocytic choriomeningitis virus and laminin, and use of the receptoid body as a reagent to neutralize virus*. *Virology*, 2004. **325**(2): p. 207-15.
187. Wolf, M., A. Freiberg, T. Zhang, Z. Akyol-Ataman, A. Grock, P. Hong, J. Li, N. Watson, A. Fang, H. Aguilar, M. Porotto, A. Honko, R. Damoiseaux, J. Miller, S. Woodson, S. Chantasirivisal, V. Fontanes, O. Negrete, P. Krogstad, A. Dasgupta, A. Moscona, L. Hensley, S. Whelan, K. Faull, M. Holbrook, M. Jung, and B. Lee, *A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(7): p. 3157-62.
188. Larson, R., D. Dai, V. Hosack, Y. Tan, T. Bolken, D. Hruby, and S. Amberg, *Identification of a broad-spectrum arenavirus entry inhibitor*. *J Virol*, 2008. **82**(21): p. 10768-75.
189. York, J., D. Dai, S. Amberg, and J. Nunberg, *pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors*. *J Virol*, 2008. **82**(21): p. 10932-9.
190. Cashman, K., M. Smith, N. Twenhafel, R. Larson, K. Jones, R.I. Allen, D. Dai, J. Chinsangaram, T. Bolken, D. Hruby, S. Amberg, L. Hensley, and M. Guttieri, *Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model*. *Antiviral Res*, 2011. **90**(1): p. 70-9.
191. Canonico, P., P. Jahrling, and W. Pannier, *Antiviral efficacy of pyrazofurin against selected RNA viruses*. *Antiviral Res*, 1982. **2**(6): p. 331-7.
192. Mendenhall, M., A. Russell, T. Juelich, E. Messina, D. Smee, A. Freiberg, M. Holbrook, Y. Furuta, d.l.T. JC, J. Nunberg, and B. Gowen, *T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(2): p. 782-7.
193. Gowen, B., D. Smee, M. Wong, J. Hall, K. Jung, K. Bailey, J. Stevens, Y. Furuta, and J. Morrey, *Treatment of late stage disease in a model of arenaviral hemorrhagic fever: T-705 efficacy and reduced toxicity suggests an alternative to ribavirin*. *PLoS One*, 2008. **3**(11): p. e3725.
194. Mendenhall, M., A. Russell, D. Smee, J. Hall, R. Skirpstunas, Y. Furuta, and B. Gowen, *Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic Fever*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2011. **5**(10): p. e1342.
195. Sánchez, A., M. Perez, T. Cornu, and J. de la Torre, *RNA interference-mediated virus clearance from cells both acutely and chronically infected with the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus*. *J Virol*, 2005. **79**(17): p. 11071-81.
196. Müller, S. and S. Günther, *Broad-spectrum antiviral activity of small interfering RNA targeting the conserved RNA termini of Lassa virus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 2215-8.
197. Pasquato, A., P. Pullikotil, M. Asselin, M. Vacatello, L. Paolillo, F. Ghezzi, F. Basso, C. Di Bello, M. Dettin, and N. Seidah, *The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(33): p. 23471-81.
198. Urata, S., N. Yun, A. Pasquato, S. Paessler, S. Kunz, and J. de la Torre, *Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of arenavirus glycoprotein processing by the cellular site 1 protease*. *J Virol*, 2011. **85**(2): p. 795-803.
199. Maisa, A., U. Ströher, H. Klenk, W. Garten, and T. Strecker, *Inhibition of Lassa virus glycoprotein cleavage and multicycle replication by site 1 protease-adapted alpha(1)-antitrypsin variants*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009. **3**(6): p. e446.

200. Radoshitzky, S., L. Dong, X. Chi, J. Clester, C. Retterer, K. Spurgers, J. Kuhn, S. Sandwick, G. Ruthel, K. Kota, D. Boltz, T. Warren, P. Kranzusch, S. Whelan, and S. Bavari, *Infectious Lassa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin*. *J Virol*, 2010. **84**(20): p. 10569-80.
201. Sakuma, T., T. Noda, S. Urata, Y. Kawaoka, and J. Yasuda, *Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin*. *J Virol*, 2009. **83**(5): p. 2382-5.
202. Fennewald, S., E. Scott, L. Zhang, X. Yang, J. Aronson, D. Gorenstein, B. Luxon, R. Shope, D. Beasley, A. Barrett, and N. Herzog, *Thioaptamer decoy targeting of AP-1 proteins influences cytokine expression and the outcome of arenavirus infections*. *J Gen Virol*, 2007. **88**(Pt 3): p. 981-90.
203. Vela, E.M., G.C. Bowick, N.K. Herzog, and J.F. Aronson, *Genistein treatment of cells inhibits arenavirus infection*. *Antiviral Res*, 2008. **77**(2): p. 153-6.
204. Kolokoltsov, A., S. Adhikary, J. Garver, L. Johnson, R. Davey, and E. Vela, *Inhibition of Lassa virus and Ebola virus infection in host cells treated with the kinase inhibitors genistein and tyrphostin*. *Arch Virol*, 2012. **157**(1): p. 121-7.
205. Soares, M., S. King, and P. Thorpe, *Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases*. *Nat Med*, 2008. **14**(12): p. 1357-62.
206. Panchal, R., S. Reid, J. Tran, A. Bergeron, J. Wells, K. Kota, J. Aman, and S. Bavari, *Identification of an antioxidant small-molecule with broad-spectrum antiviral activity*. *Antiviral Res*, 2012. **93**(1): p. 23-9.
207. Wulff, H., B.M. McIntosh, D.B. Hamner, and K.M. Jonson, *Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa*. *Bull World Health Organ*, 1977. **55**: p. 441-4.
208. Johnson, K., P. Taylor, L. Elliott, and O. Tomori, *Recovery of a Lassa-related arenavirus in Zimbabwe*. *Am J Trop Med Hyg*, 1981. **30**(6): p. 1291-3.
209. Borremans, B., H. Leirs, S. Gryseels, S. Günther, R. Makundi, and J. de Bellocq, *Presence of Mopeia virus, an African arenavirus, related to biotope and individual rodent host characteristics: implications for virus transmission*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011. **11**(8): p. 1125-31.
210. Moshkoff, D., M. Salvato, and I. Lukashevich, *Molecular characterization of a reassortant virus derived from Lassa and Mopeia viruses*. *Virus Genes*, 2007. **34**(2): p. 169-76.
211. Wilson, S.M. and J.C.S. Clegg, *Sequence analysis of the S RNA of the African Arenavirus Mopeia: An unusual secondary structure feature in the intergenic region*. *Virology*, 1991. **180**(2): p. 543-52.
212. Blackburn, N., L. Searle, and P. Taylor, *Viral haemorrhagic fever antibodies in Zimbabwe schoolchildren*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1982. **76**(6): p. 803-5.
213. Kerber, R., T. Rieger, C. Busch, L. Flatz, D. Pinschewer, B. Kümmerer, and S. Günther, *Cross-species analysis of the replication complex of Old World arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in L protein function*. *J Virol*, 2011. **85**(23): p. 12518-28.
214. Vieth, S., A. Torda, M. Asper, H. Schmitz, and S. Günther, *Sequence analysis of L RNA of Lassa virus*. *Virology*, 2004. **318**(1): p. 153-68.
215. Lukashevich, I., R. Maryankova, A. Vladyko, N. Nashkevich, S. Koleda, M. Djavani, D. Horejsh, N. Voitenok, and M. Salvato, *Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression*. *J Med Virol*, 1999. **59**(4): p. 552-60.
216. Macal, M., G. Lewis, S. Kunz, R. Flavell, J. Harker, and E. Zúñiga, *Plasmacytoid Dendritic Cells Are Productively Infected and Activated through TLR-7 Early after Arenavirus Infection*. *Cell Host Microbe*, 2012. **11**(6): p. 617-30.

217. Pannetier, D., C. Faure, M.-C. Georges-Courbot, V. Deubel, and S. Baize, *Human macrophages, but not dendritic cells, are activated and produce alpha/beta interferons in response to Mopeia virus infection*. *J Virol*, 2004. **78**(19): p. 10516-24.
218. Chapuis, F., M. Rosenzweig, M. Yagello, M. Ekman, P. Biberfeld, and J. Gluckman, *Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(2): p. 431-41.
219. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka, *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
220. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen Recognition and Innate Immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
221. Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira, *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. *Nature*, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
222. Schlee, M., A. Roth, V. Hornung, C. Hagmann, V. Wimmenauer, W. Barchet, C. Coch, M. Janke, A. Mihailovic, G. Wardle, S. Juranek, H. Kato, T. Kawai, H. Poeck, K. Fitzgerald, O. Takeuchi, S. Akira, T. Tuschl, E. Latz, J. Ludwig, and G. Hartmann, *Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus*. *Immunity*, 2009. **31**(1): p. 25-34.
223. Pichlmair, A., O. Schulz, n.C. Ta, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo, and C. Reis e Sousa, *Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection*. *J Virol*, 2009. **83**(20): p. 10761-9.
224. Edelmann, K., S. Richardson-Burns, L. Alexopoulou, K. Tyler, R. Flavell, and M. Oldstone, *Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?* *Virology*, 2004. **322**(2): p. 231-8.
225. Zhou, S., E. Kurt-Jones, L. Mandell, A. Cerny, M. Chan, D. Golenbock, and R. Finberg, *MyD88 is critical for the development of innate and adaptive immunity during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(3): p. 822-30.
226. Hayes, M., R.J. Carrion, J. Nunneley, A. Medvedev, M. Salvato, and I. Lukashevich, *Pathogenic Old World arenaviruses inhibit TLR2/Mal-dependent proinflammatory cytokines in vitro*. *J Virol*, 2012. **83**(13): p. 7216-26.
227. Habjan, M., I. Andersson, J. Klingström, M. Schümann, A. Martin, P. Zimmermann, V. Wagner, A. Pichlmair, U. Schneider, E. Mühlberger, A. Mirazimi, and F. Weber, *Processing of Genome 5' Termini as a Strategy of Negative-Strand RNA Viruses to Avoid RIG-I-Dependent Interferon Induction*. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. e2032.
228. Huang, C., O. Kolokoltsova, N. Yun, A. Seregin, A. Poussard, A. Walker, A. Brasier, Y. Zhao, B. Tian, J. de la Torre, and S. Paessler, *Junin virus infection activates the type I interferon pathway in a RIG-I-dependent manner*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(5): p. e1659.
229. Weber, F., V. Wagner, S. Rasmussen, R. Hartmann, and S. Paludan, *Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses*. *J Virol*, 2006. **80**(10).
230. Martínez-Sobrido, L., E. Zúñiga, D. Rosario, A. García-Sastre, and J. de la Torre, *Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus*. *J Virol*, 2006. **80**(18): p. 9192-9.
231. Martinez-Sobrido, L., P. Giannakas, B. Cubitt, A. Garcia-Sastre, and J.C. de la Torre, *Differential Inhibition of Type I Interferon Induction by Arenavirus Nucleoproteins*. *J Virol*, 2007. **81**(22): p. 12696-703.

232. Pythoud, C., W. Rodrigo, G. Pasqual, S. Rothenberger, L. Martínez-Sobrido, J. de la Torre, and S. Kunz, *Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKε*. *J Virol*, 2012. **86**(15): p. 7728-38.
233. Hastie, K., S. Bale, C. Kimberlin, and E. Saphire, *Hiding the evidence: two strategies for innate immune evasion by hemorrhagic fever viruses*. *Curr Opin Virol*, 2012. **2**(2): p. 151-6.
234. Rodrigo, W., E. Ortiz-Riaño, C. Pythoud, S. Kunz, J. de la Torre, and L. Martínez-Sobrido, *Arenavirus nucleoproteins prevent activation of nuclear factor kappa B*. *J Virol*, 2012. **86**(15): p. 8185-97.
235. Fan, L., T. Briese, and W. Lipkin, *Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction*. *J Virol*, 2010. **84**(4): p. 1785-91.
236. Platanias, L., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(5): p. 375-86.
237. Garcia-Sastre, A. and C. Biron, *Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente*. *Science*, 2006. **312**(5275): p. 879-82.
238. Baize, S., D. Pannetier, C. Faure, P. Marianneau, I. Marendat, M.-C. Georges-Courbot, and V. Deubel, *Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages*. *Microbes Infect*, 2006. **8**(5): p. 1194-202.
239. Miyagi, T., M. Gil, X. Wang, J. Louten, W. Chu, and C. Biron, *High basal STAT4 balanced by STAT1 induction to control type 1 interferon effects in natural killer cells*. *J Exp Med*, 1997. **204**(10): p. 2383-96.
240. Orange, J. and C. Biron, *An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections*. *J Immunol*, 1996. **156**(3): p. 1138-42.
241. Djavani, M., O. Crasta, J. Zapata, Z. Fei, O. Folkerts, B. Sobral, M. Swindells, J. Bryant, H. Davis, C. Pauza, I. Lukashevich, R. Hammamieh, M. Jett, and M. Salvato, *Early blood profiles of virus infection in a monkey model for Lassa fever*. *J Virol*, 2007. **81**(15): p. 7960-73.
242. Scott, E.P. and J.F. Aronson, *Cytokine patterns in a comparative model of arenavirus haemorrhagic fever in guinea pigs*. *J Gen Virol*, 2008. **89**(10): p. 2569-79.
243. Walker, D., K. Johnson, J. Lange, J. Gardner, M. Kiley, and J. McCormick, *Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus*. *J Infect Dis*, 1982. **146**(3): p. 360-8.
244. Wulff, H. and K. Johnson, *Immunoglobulin M and G responses measured by immunofluorescence in patients with Lassa or Marburg virus infections*. *Bull World Health Organ*, 1979. **57**(4): p. 631-5.
245. Branco, L., J. Grove, M. Boisen, J. Shaffer, A. Goba, M. Fullah, M. Momoh, D. Grant, and R. Garry, *Emerging trends in Lassa fever: redefining the role of immunoglobulin M and inflammation in diagnosing acute infection*. *Virol J*, 2011. **8**(478): p. 1-15.
246. Günther, S., O. Kühle, D. Rehder, G. Odaibo, D. Olaleye, P. Emmerich, J. ter Meulen, and H. Schmitz, *Antibodies to Lassa virus Z protein and nucleoprotein co-occur in human sera from Lassa fever endemic regions*. *Med Microbiol Immunol*, 2001. **189**(4): p. 225-9.
247. Frame, J., G. Verbrugge, R. Gill, and L. Pinneo, *The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984. **78**(3): p. 319-24.
248. Jahrling, P., *Protection of Lassa virus-infected guinea pigs with Lassa-immune plasma of guinea pig, primate, and human origin*. *J Med Virol*, 1983. **12**(2): p. 93-102.

249. Jahrling, P. and C. Peters, *Passive antibody therapy of Lassa fever in cynomolgus monkeys: importance of neutralizing antibody and Lassa virus strain*. *Infect Immun*, 1984. **44**(2): p. 528-33.
250. Enria, D., A. Briggiler, N. Fernandez, S. Levis, and J. Maiztegui, *Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma*. *Lancet*, 1984. **2**(8397): p. 255-6.
251. Jahrling, P., J. Frame, J. Rhoderick, and M. Monson, *Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985. **79**(3): p. 380-4.
252. Planz, O., P. Seiler, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel, *Specific cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies*. *Nature*, 1996. **382**: p. 726-9.
253. Morrison, H., S. Bauer, J. Lange, J. Esposito, J. McCormick, and D. Auperin, *Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus*. *Virology*, 1989. **171**(1): p. 179-88.
254. McCormick, J., S. Mitchell, M. Kiley, S. Ruo, and S. Fisher-Hoch, *Inactivated Lassa virus elicits a non protective immune response in rhesus monkeys*. *J Med Virol*, 1992. **37**(1): p. 1-7.
255. Lewis, R., T. Cosgriff, B. Griffin, J. Rhoderick, and P. Jahrling, *Immune serum increases arenavirus replication in monocytes*. *J Gen Virol*, 1988. **69**(Pt 7): p. 1735-9.
256. Steele, K., A. Anderson, and M. Mohamadzadeh, *Fibroblastic reticular cell infection by hemorrhagic fever viruses*. *Immunotherapy*, 2009. **1**(2): p. 187-97.
257. Pannetier, D., S. Reynard, M. Russier, A. Journeaux, N. Tordo, V. Deubel, and S. Baize, *Human dendritic cells infected with the non-pathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than with Lassa virus*. *J Virol*, 2011. **85**(16): p. 8293-306.
258. Goicochea, M., J. Zapata, J. Bryant, H. Davis, M. Salvato, and I. Lukashevich, *Evaluation of Lassa virus vaccine immunogenicity in a CBA/J-ML29 mouse model*. *Vaccine*, 2012. **30**(8): p. 1445-52.
259. Ter Meulen, J., M. Badusche, K. Kuhnt, A. Doetze, J. Satoguina, M. T, C. Loeliger, K. Koulemou, L. Koivogui, H. Schmitz, and e. al, *Characterization of human CD4+ T cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein*. *J Virol*, 2000. **74**: p. 2186-92.
260. La Posta, V., D. Auperin, R. Kamin-Lewis, and G. Cole, *Cross-protection against lymphocytic choriomeningitis virus mediated by a CD4+ T-cell clone specific for an envelope glycoprotein epitope of Lassa virus*. *J Virol*, 1993. **67**(6): p. 3497-506.
261. Oldstone, M., *Biology and pathogenesis of lymphocytic choriomeningitis virus infection*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. **263**: p. 83-117.
262. Russier, M., D. Pannetier, and S. Baize, *Immune responses and lassa virus infection*. *Viruses*, 2012. **4**(11): p. 2766-85.
263. Fisher-Hoch, S. and J. McCormick, *Towards a human Lassa fever vaccine*. *Rev Med Virol*, 2001. **11**(5): p. 331-41.
264. Zhang, L., K. Marriott, D. Harnish, and J. Aronson, *Reassortant analysis of guinea pig virulence of pichinde virus variants*. *Virology*, 2001. **290**(1): p. 30-8.
265. Lukashevich, I., R.J. Carrion, M. Salvato, K. Mansfield, K. Brasky, J. Zapata, C. Cairo, M. Goicochea, G. Hoosien, A. Ticer, J. Bryant, H. Davis, R. Hammamieh, M. Mayda, M. Jett, and J. Patterson, *Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates*. *Vaccine*, 2008. **26**(41): p. 5246-54.

266. Bergthaler, A., N. Gerber, D. Merkler, E. Horvath, J. de la Torre, and D. Pinschewer, *Envelope exchange for the generation of live-attenuated arenavirus vaccines*. PLoS Pathog, 2006. **2**(6): p. e51.
267. Emonet, S.F., L. Garidou, D.B. McGavern, and J.C. De la Torre, *Generation of recombinant lymphocytic choriomeningitis viruses with trisegmented genomes stably expressing two additional genes of interest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3473-8.
268. McKee, K.J., J. Oro, A. Kuehne, J. Spisso, and B. Mahlandt, *Candid No. 1 Argentine hemorrhagic fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in rhesus macaques*. Intervirology, 1992. **34**(3): p. 154-63.
269. Albariño, C., B. Bird, A. Chakrabarti, K. Dodd, D. White, E. Bergeron, P. Shrivastava-Ranjan, and S. Nichol, *Reverse genetics generation of chimeric infectious Junin/Lassa virus is dependent on interaction of homologous glycoprotein stable signal peptide and G2 cytoplasmic domains*. J Virol, 2001. **85**(1): p. 112-22.
270. Clegg, J. and G. Lloyd, *Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guineapigs against Lassa fever*. Lancet, 1987. **2**(8552): p. 186-8.
271. Auperin, D., J. Esposito, J. Lange, S. Bauer, J. Knight, D. Sasso, and J. McCormick, *Construction of a recombinant vaccinia virus expressing the Lassa virus glycoprotein gene and protection of guinea pigs from a lethal Lassa virus infection*. Virus Res, 1988. **9**(2-3): p. 233-48.
272. Fisher-Hoch, S., J. McCormick, D. Auperin, B. Brown, M. Castor, G. Perez, S. Ruo, A. Conaty, L. Brammer, and S. Bauer, *Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(1): p. 317-21.
273. Fisher-Hoch, S., L. Hutwagner, B. Brown, and J. McCormick, *Effective vaccine for Lassa fever*. J Virol, 2000. **74**: p. 6777-83.
274. Garbutt, M., R. Liebscher, V. Wahl-Jensen, S. Jones, P. Möller, R. Wagner, V. Volchkov, H. Klenk, H. Feldmann, and U. Ströher, *Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses*. J Virol, 2004. **78**(10): p. 5458-75.
275. Geisbert, T., S. Jones, E. Fritz, A. Shurtleff, J. Geisbert, R. Liebscher, A. Grolla, U. Ströher, L. Fernando, K. Daddario, M. Guttieri, B. Mothé, T. Larsen, L. Hensley, P. Jahrling, and H. Feldmann, *Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever*. PLoS Med, 2005. **2**(6): p. e183.
276. Bredenbeek, P., R. Molenkamp, W. Spaan, V. Deubel, P. Marianneau, M. Salvato, D. Moshkoff, J. Zapata, I. Tikhonov, J. Patterson, R. Carrion, A. Ticer, K. Brasky, and I. Lukashevich, *A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins*. Virology, 2006. **345**(2): p. 299-304.
277. Jiang, X., T. Dalebout, P. Bredenbeek, R.J. Carrion, K. Brasky, J. Patterson, M. Goicochea, J. Bryant, M. Salvato, and I. Lukashevich, *Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs*. Vaccine, 2011. **29**(6): p. 1248-57.
278. Pushko, P., J. Geisbert, M. Parker, P. Jahrling, and J. Smith, *Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses*. J Virol, 2001. **75**(23): p. 11677-85.
279. Branco, L., J. Grove, F. Geske, M. Boisen, I. Muncy, S. Magliato, L. Henderson, R. Schoepp, K. Cashman, L. Hensley, and R. Garry, *Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever*. Virol J, 2001. **7**(279): p. 1-19.
280. Rodriguez-Carreno, M., M. Nelson, J. Botten, K. Smith-Nixon, M. Buchmeier, and J. Whitton, *Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein*. Virology, 2005. **335**(1): p. 87-98.
281. Grant-Klein, R., L. Altamura, and C. Schmaljohn, *Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses*. Virus Res, 2011. **162**(1-2): p. 148-61.

282. Djavani, M., C. Yin, L. Xia, I. Lukashevich, C. Pauza, and M.S. Salvato, *Murine immune responses to mucosally delivered Salmonella expressing Lassa fever virus nucleoprotein*. *Vaccine*, 2000. **18**(15): p. 1543-54.
283. Djavani, M., C. Yin, I. Lukashevich, J. Rodas, S. Rai, and M. Salvato, *Mucosal immunization with Salmonella typhimurium expressing Lassa virus nucleocapsid protein cross-protects mice from lethal challenge with lymphocytic choriomeningitis virus*. *J Hum Virol*, 2001. **4**(2): p. 103-8.
284. Oldstone, M., H. Lewicki, D. Homann, C. Nguyen, S. Julien, and J. Gairin, *Common antiviral cytotoxic t-lymphocyte epitope for diverse arenaviruses*. *J Virol*, 2001. **75**(14): p. 6273-8.
285. Meulen, J., M. Badusche, J. Satoguina, T. Strecker, O. Lenz, C. Loeliger, M. Sakho, K. Koulemou, L. Koivogui, and A. Hoerauf, *Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones*. *Virology*, 2004. **321**(1): p. 134-43.
286. Kotturi, M., J. Botten, J. Sidney, H. Bui, L. Giancola, M. Maybeno, J. Babin, C. Oseroff, V. Pasquetto, J. Greenbaum, B. Peters, J. Ting, D. Do, L. Vang, J. Alexander, H. Grey, M. Buchmeier, and A. Sette, *A multivalent and cross-protective vaccine strategy against arenaviruses associated with human disease*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(12): p. e1000695.
287. Kotturi, M., J. Botten, M. Maybeno, J. Sidney, J. Glenn, H. Bui, C. Oseroff, S. Crotty, B. Peters, H. Grey, D. Altmann, M. Buchmeier, and A. Sette, *Polyfunctional CD4+ T cell responses to a set of pathogenic arenaviruses provide broad population coverage*. *Immunome Res*, 2010. **6**(4): p. 1-14.
288. Sanchez, A., T. Geisbert, and H. Feldmann, *Filoviridae: Marburg and Ebola viruses*. *Fields Virology*, ed. D. Knipe and P. Howley. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1409-48.
289. Noda, T., H. Sagara, E. Suzuki, A. Takada, H. Kida, and Y. Kawaoka, *Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP*. *J Virol*, 2002. **76**(10): p. 4855-65.
290. Dolnik, O., V. Volchkova, W. Garten, C. Carbonnelle, S. Becker, J. Kahnt, S. U, H. Klenk, and V. Volchkov, *Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus*. *EMBO J*, 2004. **23**(10): p. 2175-84.
291. Formenty, P., C. Boesch, M. Wyers, C. Steiner, F. Donati, F. Dind, F. Walker, and B. Le Guenno, *Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(Suppl 1): p. S120-6.
292. Miranda, M., T. Ksiazek, T. Retuya, A. Khan, A. Sanchez, C. Fulhorst, P. Rollin, A. Calaor, D. Manalo, M. Roces, M. Dayrit, and C. Peters, *Epidemiology of Ebola (subtype Reston) virus in the Philippines, 1996*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(Suppl 1): p. S115-9.
293. Barrette, R., S. Metwally, J. Rowland, L. Xu, S. Zaki, S. Nichol, P. Rollin, J. Towner, W. Shieh, B. Batten, T. Sealy, C. Carrillo, K. Moran, A. Bracht, G. Mayr, M. Sirios-Cruz, D. Catbagan, E. Lautner, T. Ksiazek, W. White, and M. McIntosh, *Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus*. *Science*, 2009. **325**(5937): p. 204-6.
294. Feldmann, H. and T. Geisbert, *Ebola haemorrhagic fever*. *Lancet*, 2011. **337**(9768): p. 849-62.
295. Leroy, E., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Délicat, J. Paweska, J. Gonzalez, and R. Swanepoel, *Fruit bats as reservoirs of Ebola virus*. *Nature*, 2005. **438**(7068): p. 575-6.
296. Towner, J., B. Amman, T. Sealy, S. Carroll, J. Comer, A. Kemp, R. Swanepoel, C. Paddock, S. Balinandi, M. Khristova, P. Formenty, C. Albarino, D. Miller, Z. Reed, J. Kayiwa, J. Mills, D. Cannon, P. Greer, E. Byaruhanga, E. Farnon, P. Atimnedi, S. Okware, E. Katongole-Mbidde, R. Downing, J. Tappero, S. Zaki, T. Ksiazek, S. Nichol, and P. Rollin, *Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(7): p. e1000536.

297. Leroy, E., A. Epelboin, V. Mondonge, X. Pourrut, J. Gonzalez, J. Muyembe-Tamfum, and P. Formenty, *Human Ebola outbreak resulting from direct exposure to fruit bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2009. **9**(6): p. 723-8.
298. Georges-Courbot, M., A. Sanchez, C. Lu, S. Baize, E. Leroy, J. Lansout-Soukate, C. Tévi-Bénissan, A. Georges, S. Trappier, S. Zaki, R. Swanepoel, P. Leman, P. Rollin, C. Peters, S. Nichol, and T. Ksiazek, *Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon*. *Emerg Infect Dis*, 1997. **3**(3): p. 59-62.
299. Geisbert, T.W., L.E. Hensley, T. Larsen, H.A. Young, D.S. Reed, J.B. Geisbert, D.P. Scott, E. Kagan, P.B. Jahrling, and K.J. Davis, *Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2347-70.
300. Mahanty, S. and M. Bray, *Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2004. **4**(8): p. 487-98.
301. Arthur, R., *Ebola in Africa--discoveries in the past decade*. *Euro Surveill*, 2002. **7**(3): p. 33-6.
302. MacNeil, A., E. Farnon, J. Wamala, S. Okware, D. Cannon, Z. Reed, J. Towner, J. Tappero, J. Lutwama, R. Downing, S. Nichol, T. Ksiazek, and P. Rollin, *Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda*. *Emerg Infect Dis*, 2010. **16**(12): p. 1969-72.
303. Geisbert, T., H. Young, P. Jahrling, K. Davis, T. Larsen, E. Kagan, and L. Hensley, *Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(6): p. 2371-82.
304. Hensley, L., H. Young, P. Jahrling, and T. Geisbert, *Proinflammatory response during Ebola virus infection of primate models: possible involvement of the tumor necrosis factor receptor superfamily*. *Immunol Lett*, 2002. **80**(3): p. 169-79.
305. Simmons, G., J. Reeves, C. Grogan, L. Vandenberghe, F. Baribaud, J. Whitbeck, E. Burke, M. Buchmeier, E. Soilleux, J. Riley, R. Doms, P. Bates, and S. Pöhlmann, *DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells*. *Virology*, 2003. **305**(1): p. 115-23.
306. Takada, A., K. Fujioka, M. Tsuiji, A. Morikawa, N. Higashi, H. Ebihara, D. Kobasa, H. Feldmann, T. Irimura, and Y. Kawaoka, *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry*. *J Virol*, 2004. **78**(6): p. 2943-7.
307. Geisbert, T., H. Young, P. Jahrling, K. Davis, E. Kagan, and L. Hensley, *Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event*. *J Infect Dis*, 2003. **188**(11): p. 1618-29.
308. Feldmann, H., H. Bugany, F. Mahner, H. Klenk, D. Drenckhahn, and H. Schnittler, *Filovirus-induced endothelial leakage triggered by infected monocytes/macrophages*. *J Virol*, 1996. **70**(4): p. 2208-14.
309. Yang, Z., H. Duckers, N. Sullivan, A. Sanchez, E. Nabel, and G. Nabel, *Identification of the Ebola virus glycoprotein as the main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury*. *Nat Med*, 2000. **6**(8): p. 886-9.
310. Weissenhorn, W., A. Carfi, K. Lee, J. Skehel, and D. Wiley, *Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain*. *Mol Cell*, 1998. **2**(5): p. 605-16.
311. Alazard-Dany, N., V. Volchkova, O. Reynard, C. Carbonnelle, O. Dolnik, M. Ottmann, A. Khromykh, and V. Volchkov, *Ebola virus glycoprotein GP is not cytotoxic when expressed constitutively at a moderate level*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt5): p. 1247-57.
312. Barrientos, L. and P. Rollin, *Release of cellular proteases into the acidic extracellular milieu exacerbates Ebola virus-induced cell damage*. *Virology*, 2007. **358**(1): p. 1-9.

313. Bosio, C., M. Aman, C. Grogan, R. Hogan, G. Ruthel, D. Negley, M. Mohamadzadeh, S. Bavari, and A. Schmaljohn, *Ebola and Marburg viruses replicate in monocyte-derived dendritic cells without inducing the production of cytokines and full maturation*. J Infect Dis, 2003. **188**(11): p. 1630-8.
314. Gupta, M., S. Mahanty, R. Ahmed, and P. Rollin, *Monocyte-derived human macrophages and peripheral blood mononuclear cells infected with ebola virus secrete MIP-1alpha and TNF-alpha and inhibit poly-IC-induced IFN-alpha in vitro*. Virology, 2001. **284**(1): p. 20-5.
315. Ströher, U., E. West, H. Bugany, H. Klenk, H. Schnittler, and H. Feldmann, *Infection and activation of monocytes by Marburg and Ebola viruses*. J Virol, 2001. **75**(22): p. 11025-33.
316. Baize, S., E. Leroy, A. Georges, M. Georges-Courbot, M. Capron, I. Bedjabaga, J. Lansoud-Soukate, and E. Mavoungou, *Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients*. Clin Exp Immunol, 2002. **128**(1): p. 163-8.
317. Okumura, A., P. Pitha, A. Yoshimura, and R. Harty, *Interaction between Ebola virus glycoprotein and host toll-like receptor 4 leads to induction of proinflammatory cytokines and SOCS1*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 27-33.
318. Bray, M., *The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 6): p. 1365-73.
319. Raymond, J., S. Bradfute, and M. Bray, *Filovirus infection of STAT-1 knockout mice*. J Infect Dis, 2011. **204**(Suppl 3): p. S986-90.
320. Jahrling, P., T. Geisbert, J. Geisbert, J. Swearengen, M. Bray, N. Jaax, J. Huggins, J. LeDuc, and C. Peters, *Evaluation of immune globulin and recombinant interferon-alpha2b for treatment of experimental Ebola virus infections*. J Infect Dis, 1999. **179**(Suppl 1): p. S224-34.
321. Baize, S., E. Leroy, M. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debré, S. Fisher-Hoch, J. McCormick, and A. Georges, *Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 423-6.
322. Volchkov, V., V. Blinov, and S. Netesov, *The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses*. FEBS Lett, 1992. **305**(3): p. 181-4.
323. Georges-Courbot, M.-C. and S. Baize, *Les Filovirus*. Virologie, 2007. **11**(7): p. 105-20.
324. Basler, C., X. Wang, E. Mühlberger, V. Volchkov, J. Paragas, H. Klenk, A. García-Sastre, and P. Palese, *The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12289-94.
325. Cárdenas, W., Y. Loo, M.J. Gale, A. Hartman, C. Kimberlin, L. Martínez-Sobrido, E. Saphire, and C. Basler, *Ebola Virus VP35 Protein Binds Double-Stranded RNA and Inhibits Alpha/Beta Interferon Production Induced by RIG-I Signaling*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5168-78.
326. Basler, C., A. Mikulasova, L. Martinez-Sobrido, J. Paragas, E. Mühlberger, M. Bray, H. Klenk, P. Palese, and A. García-Sastre, *The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7945-56.
327. Prins, K., W. Cárdenas, and C. Basler, *Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3069-77.
328. Feng, Z., M. Cerveny, Z. Yan, and B. He, *The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR*. J Virol, 2007. **81**(1): p. 182-92.
329. Mateo, M., S.P. Reid, L.W. Leung, C.F. Basler, and V.E. Volchkov, *Ebolavirus VP24 binding to karyopherins is required for inhibition of interferon signaling*. J Virol, 2010. **84**(2): p. 1169-75.

330. Reid, S.P., L.W. Leung, A.L. Hartman, O. Martinez, M.L. Shaw, C. Carbonnelle, V.E. Volchkov, S.T. Nichol, and C.F. Basler, *Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation*. J Virol, 2006. **80**(11): p. 5156-67.
331. Reid, S.P., C. Valmas, O. Martinez, F.M. Sanchez, and C.F. Basler, *Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13469-77.
332. Simmons, G., R. Wool-Lewis, F. Baribaud, R. Netter, and P. Bates, *Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence*. J Virol, 2002. **76**(5): p. 2518-28.
333. Reynard, O., M. Borowiak, V.A. Volchkova, S. Delpout, M. Mateo, and V.E. Volchkov, *Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins*. J Virol, 2009. **83**(18): p. 9596-601.
334. Yang, Z., R. Delgado, L. Xu, R. Todd, E. Nabel, A. Sanchez, and G. Nabel, *Distinct cellular interactions of secreted and transmembrane Ebola virus glycoproteins*. Science, 1998. **279**(5353): p. 1034-7.
335. Warren, T., K. Warfield, J. Wells, D. Swenson, K. Donner, S. Van Tongeren, N. Garza, L. Dong, D. Mourich, S. Crumley, D. Nichols, P. Iversen, and S. Bavari, *Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections*. Nat Med, 2010. **16**(9): p. 991-4.
336. Jahrling, P., J. Geisbert, J. Swarengen, G. Jaax, T. Lewis, J. Huggins, J. Schmidt, J. LeDuc, and C. Peters, *Passive immunization of Ebola virus-infected cynomolgus monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses*. Arch Virol Suppl, 1996. **11**: p. 135-40.
337. Mupapa, K., M. Massamba, K. Kibadi, K. Kuvula, A. Bwaka, M. Kipasa, R. Colebunders, and J. Muyembe-Tamfum, *Treatment of Ebola hemorrhagic fever with blood transfusions from convalescent patients*. International Scientific and Technical Committee. J Infect Dis, 1999. **179**(Suppl 1): p. S18-23.
338. Wilson, J., M. Hevey, R. Bakken, S. Guest, M. Bray, A. Schmaljohn, and M. Hart, *Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1664-6.
339. Geisbert, T., L. Hensley, P. Jahrling, T. Larsen, J. Geisbert, J. Paragas, H. Young, T. Fredeking, W. Rote, and G. Vlasuk, *Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys*. Lancet, 2003. **362**(9400): p. 1953-8.
340. Sullivan, N., T. Geisbert, J. Geisbert, L. Xu, Z. Yang, M. Roederer, R. Koup, P. Jahrling, and G. Nabel, *Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates*. Nature, 2003. **424**(6949): p. 681-4.
341. Bukreyev, A., P. Rollin, M. Tate, L. Yang, S. Zaki, W. Shieh, B. Murphy, P. Collins, and A. Sanchez, *Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6379-88.
342. Feldmann, H., S. Jones, K. Daddario-DiCaprio, J. Geisbert, U. Ströher, A. Grolla, M. Bray, E. Fritz, L. Fernando, F. Feldmann, L. Hensley, and T. Geisbert, *Effective post-exposure treatment of Ebola infection*. PLoS Pathog, 2007. **2**(1): p. e2.
343. Prins, K.C., S. Delpout, D.W. Leung, O. Reynard, V.A. Volchkova, S.P. Reid, P. Ramanan, W.B. Cárdenas, G.K. Amarasinghe, V.E. Volchkov, and C.F. Basler, *Mutations abrogating VP35 interaction with double-stranded RNA render Ebola virus avirulent in guinea pigs*. J Virol, 2010. **84**(6): p. 3004-15.
344. Warfield, K., D. Swenson, G. Olinger, W. Kalina, M. Aman, and S. Bavari, *Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge*. J Infect Dis, 2007. **196**(Suppl 2): p. S430-7.

345. Grégoire, C., L. Chasson, C. Luci, E. Tomasello, F. Geissmann, E. Vivier, and T. Walzer, *The trafficking of natural killer cells*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 169-82.
346. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 1975. **5**(2): p. 112-7.
347. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini, *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
348. Vivier, E., D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, and S. Ugolini, *Innate of adaptive immunity? The example of natural killer cells*. *Science*, 2011. **331**: p. 44-9.
349. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 225 - 74.
350. Mailliard, R.B., Y.-I. Son, R. Redlinger, P.T. Coates, A. Giermasz, P.A. Morel, W.J. Storkus, and P. Kalinski, *Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function*. *J Immunol*, 2003. **171**(5): p. 2366-73.
351. Freud, A. and M. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. *Immunol Rev*, 2006. **214**: p. 56-72.
352. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *TRENDS Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.
353. Poli, A., T. Michel, M. Thérésine, E. Andrès, F. Hentges, and J. Zimmer, *CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset*. *Immunology*, 2009. **126**(4): p. 458-65.
354. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson, and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. *Blood*, 2001. **97**: p. 3146 - 51.
355. De Maria, A., F. Bozzano, C. Cantoni, and L. Moretta, *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dim CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(2): p. 728-32.
356. Takahashi, E., N. Kuranaga, K. Satoh, Y. Habu, N. Shinimiya, T. Asano, S. Seki, and M. Hayakawa, *Induction of CD16+ CD56bright NK cells with antitumor cytotoxicity not only from CD16- CD56bright NK cells but also from CD16- CD56dim NK cells*. *Scandinav J Immunol*, 2007. **65**: p. 126-38.
357. Veiga-Fernandes, H., D. Kioussis, and M. Coles, *Natural killer receptors: the burden of a name*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 269-72.
358. Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, M. Vitale, M.C. Mingari, and A. Moretta, *Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis*. *Immunol Lett*, 2005. **100**(1): p. 7-13.
359. Ljunggren, H. and K. Kärre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*, 1990. **11**(7): p. 237-44.
360. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M.C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta, *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 197 - 223.
361. Biassoni, R., C. Cantoni, D. Pende, S. Sivori, S. Parolini, M. Vitale, C. Bottino, and A. Moretta, *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. *Immunol Rev*, 2001. **181**: p. 203 - 14.
362. Vyas, Y., H. Maniar, C. Lyddane, M. Sadelain, and B. Dupont, *Ligand binding to inhibitory killer cell Ig-like receptors induce colocalization with Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase 1 and interruption of ongoing activation signals*. *J Immunol*, 2004. **173**(3): p. 1571-8.

363. Biassoni, R., *Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands*. Current Protocols in Immunology, 2009. **84**: p. 14.0.1-0.40.
364. Long, E.O., D.F. Barber, D.N. Burshtyn, M. Faure, M. Peterson, S. Rajagopalan, V. Renard, M. Sandusky, C.C. Stebbins, N. Wagtmann, and C. Watzl, *Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158)*. Immunol Rev, 2001. **181**(1): p. 223-33.
365. Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta, *Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1076-86.
366. Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M.C. Mingari, and L. Moretta, *Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 228-34.
367. Sivori, S., D. Pende, C. Bottino, E. Marcenaro, A. Pessino, R. Biassoni, L. Moretta, and A. Moretta, *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1656-66.
368. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta, *Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1505-16.
369. Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni, *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily*. J Exp Med, 1999. **189**: p. 787 - 96.
370. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta, *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2065-72.
371. Arnon, T.I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, a. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D.G. Wolf, and O. Mandelboim, *Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus*. J Immunol, 2005. **6**(5): p. 515-23.
372. Vivier, E., E. Tomasello, and P. Paul, *Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 306-11.
373. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 781-90.
374. Marcenaro, E., R. Augugliaro, M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, S. Sivori, E. Romeo, R. Millo, L. Moretta, C. Bottino, and A. Moretta, *CD59 is physically and functionally associated with natural cytotoxicity receptors and activates human NK cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2003. **33**: p. 3367-76.
375. Vitale, M., M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta, *Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 233-42.
376. Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G. Sutherland, L. Lanier, and J. Phillips, *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
377. Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta, *NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to*

the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. J Exp Med, 2001. **194**(3): p. 235-46.

378. Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. Bloom, N. Domae, and H. Umehara, *Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells.* J Immunol, 2000. **164**(8): p. 4055-62.

379. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells.* J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.

380. Maghazachi, A., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells.* Curr Top Microbiol Immunol, 2010. **341**: p. 37-58.

381. Biron, C., K. Nguyen, G. Pien, L. Cousens, and S.-M. TP, *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.

382. Marcenaro, E., C. Cantoni, S. Pesce, C. Prato, D. Pende, S. Agaoglu, L. Moretta, and A. Moretta, *Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction.* Blood, 2009. **114**(19): p. 4108-16.

383. Moretta, A., *The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells.* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 306-11.

384. Moretta, L., G. Ferlazzo, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, M. CMingari, and A. Moretta, *Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions.* Immunol Rev, 2006. **214**(1): p. 219-28.

385. Afonina, I.S., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B.* Immunol Rev, 2010. **235**(1): p. 105-16.

386. Shi, F.D. and L. Van Kaer, *Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**: p. 751 - 60.

387. Martin-Fontecha, A., L.L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for Th1 priming.* Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.

388. De Rham, C., S. Ferrari-Lacraz, S. Jendly, G. Schneiter, J.-M. Dayer, and J. Villard, *The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors.* Arthritis Research & Therapy, 2007. **9**(6): p. R125.

389. Alter, G., T.J. Suscovich, N. Teigen, A. Meier, H. Streeck, C. Brander, and M. Altfeld, *Single-Stranded RNA Derived from HIV-1 Serves as a Potent Activator of NK Cells.* J Immunol, 2007. **178**(12): p. 7658-66.

390. Girart, M.V., M.B. Fuertes, C.I. Domaica, L.E. Rossi, and N.W. Zwirner, *Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D Regulate IFN- γ Secretion but Not NKG2D-Mediated Cytotoxicity by Human NK Cells Stimulated with Suboptimal Doses of IL-12.* J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3472-9.

391. Hart, O.M., V. Athie-Morales, G.M. O'Connor, and C.M. Gardiner, *TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production.* J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1636-42.

392. Walzer, T., M. Dalod, S.H. Robbins, L. Zitvogel, and E. Vivier, *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force".* Blood, 2005. **106**(7): p. 2252-8.

393. Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. Muller, L. Moretta, and C. Münz, *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16606-11.

394. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri, *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 327-33.
395. Borg, C., A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard, and L. Zitvogel, *NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3267-75.
396. Chaix, J., M. Tessmer, K. Hoebe, N. Fuséri, B. Ryffel, M. Dalod, L. Alexopoulou, B. Beutler, L. Brossay, E. Vivier, and T. Walzer, *Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 1627-31.
397. Brilot, F., T. Strowig, S.M. Roberts, F. Arrey, and C. Münz, *NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 α* . *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3316-29.
398. Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele, and A. Diefenbach, *Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 503-17.
399. Chiesa, M.D., C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta, and A. Moretta, *Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses*. *Blood*, 2006. **108**(12): p. 3851-8.
400. Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra, and G. Trinchieri, *The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 727-34.
401. Fernandez, N.C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel, *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 405-11.
402. Ferlazzo, G., M.L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R.M. Steinman, and C. Munz, *Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 343-51.
403. Semino, C., G. Angelini, A. Poggi, and A. Rubartelli, *NK/IDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1*. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 609-16.
404. Nedvetzki, S., S. Sowinski, R.A. Eagle, J. Harris, F. Vely, D. Pende, J. Trowsdale, E. Vivier, S. Gordon, and D.M. Davis, *Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 3776-85.
405. Vitale, M., M.D. Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Arico, L. Moretta, and A. Moretta, *NK-dependent DC maturation is mediated by TNF α and IFN γ released upon engagement of the NKp30 triggering receptor*. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 566-71.
406. Agaoglu, S., E. Marcenaro, B. Ferranti, L. Moretta, and A. Moretta, *Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells*. *Blood*, 2008. **112**(5): p. 1776-83.
407. Morandi, B., L. Mortara, P. Carrega, C. Cantoni, G. Costa, R.S. Accolla, M.C. Mingari, S. Ferrini, L. Moretta, and G. Ferlazzo, *NK cells provide helper signal for CD8 $^{+}$ T cells by inducing the expression of membrane-bound IL-15 on DCs*. *Int Immunol*, 2009. **21**(5): p. 599-606.
408. Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N.M. Valiante, *Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells*. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 335-41.
409. Carbone, E., G. Terrazzano, G. Ruggiero, D. Zanzi, A. Ottaiano, C. Manzo, K. Kärre, and S. Zappacosta, *Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(12): p. 4022-9.

410. Biron, C., K. Byron, and J. Sullivan, *Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells*. N Eng J Med, 1989. **320**(26): p. 1731-5.
411. Andoniou, C., D. Andrews, and M. Degli-Esposti, *Natural killer cells in viral infection: more than just killers*. Immunol Rev, 2006. **214**(1): p. 239-50.
412. Lee, S.-H. and C.A. Biron, *Here today - not gone tomorrow: Roles for activating receptors in sustaining NK cells during viral infections*. Eur J Immunol, 2010. **40**(4): p. 923-32.
413. Bradfute, S., D. Braun, J. Shamblin, J. Geisbert, J. Paragas, A. Garrison, L. Hensley, and T. Geisbert, *Lymphocyte Death in a Mouse Model of Ebola Virus Infection*. J Infect Dis, 2007. **196**(s2): p. S296-304.
414. Reed, D., L. Hensley, J. Geisbert, P. Jahrling, and T. Geisbert, *Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus macaques*. Viral Immunol, 2004. **17**(3): p. 390-400.
415. Amadei, B., S. Urbani, A. Cazaly, P. Fiscaro, A. Zerbin, P. Ahmed, G. Missale, C. Ferrari, and S.I. Khakoo, *Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus*. Gastroenterology, 2010. **138**(4): p. 1536-45.
416. Crotta, S., A. Stilla, A. Wack, A. D'Andrea, S. Nuti, U. D'Oro, M. Mosca, F. Filliponi, R. Brunetto, F. Bonino, S. Abrignani, and N. Valiante, *Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein*. J Exp Med, 2002. **191**(1): p. 37-41.
417. Azeredo, E.L., L.M. De Oliveira-Pinto, S.M. Zagne, D.I.S. Cerqueira, R.M.R. Nogueira, and C.F. Kubelka, *NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease*. Clin Exp Immunol, 2005. **143**: p. 345-56.
418. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlil, M. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. Fauci, *Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15011-6.
419. De Maria, A., M. Fogli, P. Costa, G. Murdaca, F. Puppò, D. Mavilio, A. Moretta, and L. Moretta, *The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (Nkp46, Nkp30 and Nkp44)*. Eur J Immunol, 2003. **33**(9): p. 2410-8.
420. Scott-Algara, D., V. Arnold, C. Didier, T. Kattan, G. Pirozzi, F. Barré-Sinoussi, and G. Pancino, *The CD85j+ NK cell subset potently controls HIV-1 replication in autologous dendritic cells*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1975.
421. Vieillard, V., J.L. Strominger, and P. Debré, *NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 10981-6.
422. Fuller, C.L., G. Ruthel, K.L. Warfield, D.L. Swenson, C.M. Bosio, M.J. Aman, and S. Bavari, *NKp30-dependent cytotoxicity of filovirus-infected human dendritic cells*. Cell Microbiol, 2007. **9**(4): p. 962-76.
423. Warfield, K.L., J.G. Perkins, D.L. Swenson, E.M. Deal, C.M. Bosio, M.J. Aman, W.M. Yokoyama, H.A. Young, and S. Bavari, *Role of Natural Killer Cells in Innate Protection against Lethal Ebola Virus Infection*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p. 169-79.
424. Newman, K.C., D.S. Korb, J.C. Hafalla, and E.M. Riley, *Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer interferon-gamma responses to malaria*. PLoS Pathog, 2006. **2**(12): p. 1120-3.
425. Baratin, M., S. Roetynck, C. Lépolard, C. Falk, S. Sawadogo, S. Uematsu, S. Akira, B. Ryffel, J.-G. Tiraby, L. Alexopoulou, C.J. Kirschning, J. Gysin, E. Vivier, and S. Ugolini, *Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14747-52.

426. Hernandez Sanabria, M.X., D.A. Vargas-Inchaustegui, L. Xin, and L. Soong, *Role of Natural Killer Cells in Modulating Dendritic Cell Responses to Leishmania amazonensis Infection*. *Infect Immun*, 2008. **76**(11): p. 5100-9.
427. Lapaque, N., T. Walzer, S. Meresse, E. Vivier, and J. Trowsdale, *Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection*. *J Immunol*, 2009. **182**(7): p. 4339-48.
428. Draghi, M., A. Pashine, B. Sanjanwala, K. Gendzekhadze, C. Cantoni, D. Cosman, A. Moretta, N.M. Valiante, and P. Parham, *NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection*. *J Immunol*, 2007. **178**(5): p. 2688-98.
429. Siren, J., T. Sareneva, J. Pirhonen, M. Strengell, V. Veckman, I. Julkunen, and S. Matikainen, *Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by Influenza A or Sendai virus-infected macrophages*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(8): p. 2357-64.
430. Fausther-Bovendo, H., N. Sol-Foulon, D. Candotti, H. Agut, O. Schwartz, P. Debré, and V. Vieillard, *HIV escape from natural killer cytotoxicity: nef inhibits NKp44L expression on CD4+ T cells*. *AIDS*, 2009. **23**(9): p. 1077-87.
431. Saïdi, H., M.-T. Melki, and M.-L. Gougeon, *HMGB1-dependent triggering of HIV-1 replication and persistence in dendritic cells as a consequence of NK-DC cross-talk*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3601.
432. Biron, C., K. Nguyen, and G. Pien, *Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002. **263**: p. 7-27.
433. Rodas, J., C. Cairo, M. Djavani, J. Zapata, T. Ruckwardt, J. Bryant, C. Pauza, I. Lukashevich, and M. Salvato, *Circulating natural killer and gammadelta T cells decrease soon after infection of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009. **104**(4): p. 583-91.
434. Nguyen, K., L. Cousens, L. Doughty, G. Pien, J. Durbin, and C. Biron, *Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 70-6.
435. Welsh, R.J., *Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction*. *J Exp Med*, 1978. **148**(1): p. 163-81.
436. Pien, G. and C. Biron, *Compartmental differences in NK cell responsiveness to IL-12 during lymphocytic choriomeningitis virus infection*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 994-1001.
437. Cousens, L., J. Orange, H. Su, and C. Biron, *Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(2): p. 634-9.
438. Lee, J., T. Chuang, V. Redecke, L. She, P. Pitha, D. Carson, E. Raz, and H. Cottam, *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
439. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. *J Immunol Methods*, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
440. Geisbert, T., L. Hensley, T. Gibb, K. Steele, N. Jaax, and P. Jahrling, *Apoptosis induced in vitro and in vivo during infection by Ebola and Marburg viruses*. *Lab Invest*, 2000. **80**(2): p. 171-86.
441. Chow, J., D. Young, D. Golenbock, W. Christ, and F. Gusovsky, *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(16): p. 10689-92.
442. Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi, *Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1249-56.

443. Mori, S., A. Jewett, M. Cavalcanti, K. Murakami-Mori, S. Nakamura, and B. Bonavida, *Differential regulation of human NK cell-associated gene expression following activation by IL-2, IFN-alpha and PMA/ionomycin*. *Int J Oncol*, 1998. **12**(5): p. 1165-70.
444. Oldstone, M.B.A. and K.P. Campbell, *Decoding arenavirus pathogenesis: Essential roles for alpha-dystroglycan-virus interactions and the immune response*. *Virology*, 2010.
445. Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homann, H. Yamada, K.P. Campbell, J.C.d.I. Torre, and M.B.A. Oldstone, *Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(9): p. 1249-60.
446. Walsh, K., J. Teijaro, E. Zuniga, M. Welch, D. Fremgen, S. Blackburn, K. von Tiehl, E. Wherry, R. Flavell, and M. Oldstone, *Toll-like receptor 7 is required for effective adaptive immune responses that prevent persistent virus infection*. *Cell Host Microbe*, 2012. **11**(6): p. 643-53.
447. Bianchi, M. and A. Manfredi, *High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 35-46.
448. Waggoner, S., M. Cornberg, L. Selin, and R. Welsh, *Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells*. *Nature*, 2011. **481**(7381): p. 394-8.
449. Lang, P., K. Lang, H. Xu, M. Grusdat, I. Parish, M. Recher, A. Elford, S. Dhanji, N. Shaabani, C. Tran, D. Dissanayake, R. Rahbar, M. Ghazarian, A. Brüstle, J. Fine, P. Chen, C. Weaver, C. Klose, A. Diefenbach, D. Häussinger, J. Carlyle, S. Kaech, T. Mak, and P. Ohashi, *Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(4): p. 1210-5.
450. Su, H., K. Nguyen, T. Salazar-Mather, M. Ruzek, M. Dalod, and C. Biron, *NK cell functions restrain T cell responses during viral infections*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(10): p. 3048-55.
451. Sauty, A., R.A. Colvin, L. Wagner, S. Rochat, S. Spertini, and A.D. Luster, *CXCR3 internalization following T cell-endothelial cell contact: preferential role of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (CXCL11)*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 7084-93.
452. Cole, K., C. Strick, T. Paradis, K. Ogborne, M. Loetscher, R. Gladue, W. Lin, J. Boyd, B. Moser, D. Wood, B. Sahagan, and K. Neote, *Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3*. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2009-21.
453. Liao, F., R. Rabin, J. Yannelli, L. Koniaris, P. Vanguri, and J. Farber, *Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization*. *J Exp Med*, 1995. **182**(5): p. 1301-14.
454. Taub, D., A. Lloyd, K. Conlon, J. Wang, J. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, n.D. Kelvi, and J. Oppenheim, *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. *J Exp Virol*, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
455. Groom, J. and A. Luster, *CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions*. *Immunol Cell Biol*, 2011. **89**(2): p. 207-15.
456. Morandi, F., E. Ferretti, R. Castriconi, A. Dondero, A. Petretto, C. Bottino, and V. Pistoia, *Soluble HLA-G dampens CD94/NKG2A expression and function and differentially modulates chemotaxis and cytokine and chemokine secretion in CD56bright and CD56dim NK cells*. *Blood*, 2011. **118**(22): p. 5840-50.
457. Lafon, M., C. Prehaud, F. Megret, M. Lafage, G. Mouillot, M. Roa, P. Moreau, N. Rouas-Freiss, and E. Carosella, *Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections*. *J Virol*, 2005. **79**(25): p. 15226-37.

458. Grégoire, C., C. Cognet, L. Chasson, C.-A. Coupet, M. Dalod, A. Reboldi, J. Marvel, F. Sallusto, E. Vivier, and T. Walzer, *Intrasplenic trafficking of natural killer cells is redirected by chemokines upon inflammation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(8): p. 2076-84.
459. Wald, O., I. Weiss, H. Wald, H. Shoham, Y. Bar-Shavit, K. Beider, E. Galun, L. Weiss, L. Flaishon, I. Shachar, A. Nagler, B. Lu, C. Gerard, Gao JL, E. Mishani, J. Farber, and A. Peled, *IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4716-29.
460. McIntyre, K. and R. Welsh, *Accumulation of natural killer and cytotoxic T large granular lymphocytes in the liver during virus infection*. J Exp Med, 1986. **164**(5): p. 1667-81.
461. Lopez-Vergès, S., J. Milush, B. Schwartz, M. Pando, J. Jarjoura, V. York, J. Houchins, S. Miller, S. Kang, P. Norris, D. Nixon, and L. Lanier, *Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14725-32.
462. Björkström, N., T. Lindgren, M. Stoltz, C. Fauriat, M. Braun, M. Evander, J. Michaëlsson, K. Malmberg, J. Klingström, C. Ahlm, and H. Ljunggren, *Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus*. J Exp Med, 2011. **208**(1): p. 13-21.
463. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 557-61.
464. Calmon-Hamaty, F., B. Combe, M. Hahne, and J. Morel, *Lymphotoxin α stimulates proliferation and pro-inflammatory cytokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Cytokine, 2011. **53**(2): p. 207-14.
465. Asper, M., T. Sternsdorf, M. Hass, C. Drosten, A. Rhode, H. Schmitz, and S. Günther, *Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 3162-9.
466. Becknell, B. and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells*. Adv Immunol, 2005. **86**: p. 209 - 39.
467. Mack, E., L. Kallal, D. Demers, and C. Biron, *Type 1 interferon induction of natural killer cell gamma interferon production for defense during lymphocytic choriomeningitis virus infection*. Mbio, 2011. **2**(4): p. e00169-11.
468. Rogge, L., D. D'Ambrosio, M. Biffi, G. Penna, L. Minetti, D. Presky, L. Adorini, and F. Sinigaglia, *The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6567-74.
469. Rook, A., J. Kehrl, L. Wakefield, A. Roberts, M. Sporn, D. Burlington, H. Lane, and A. Fauci, *Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness*. J Immunol, 1986. **136**(10): p. 3916-20.
470. Su, H., R. Hishikawa, and C. Biron, *Transforming growth factor-beta expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4874-90.
471. Bukowski, J., B. Woda, S. Habu, K. Okumura, and R. Welsh, *Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo*. J Immunol, 1983. **131**(3): p. 1531-8.
472. Welsh, R., P. Dundon, E. Eynon, J. Brubaker, G. Koo, and C. O'Donnell, *Demonstration of the antiviral role of natural killer cells in vivo with a natural killer cell-specific monoclonal antibody (NK 1.1)*. Nat Immun Cell Growth Regul, 1990. **9**(2): p. 112-20.
473. Cosman, D., J. Müllberg, C. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. Chalupny, *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.

474. Chisholm, S., K. Howard, M. Gómez, and H. Reyburn, *Expression of ICPO is sufficient to trigger natural killer cell recognition of herpes simplex virus-infected cells by natural cytotoxicity receptors*. *J Infect Dis*, 2007. **195**(8): p. 1160-8.
475. Chisholm, S. and H. Reyburn, *Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors*. *J Virol*, 2006. **80**(5): p. 2225-33.
476. Benedict, C.A., P.S. Norris, and C.F. Ware, *To kill or to be killed: viral evasion of apoptosis*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1013-8.
477. Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P. Pandolfi, P. Pelicci, and A. Dejean, *The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon*. *Oncogene*, 1995. **11**(5): p. 871-6.
478. Zheng, P., Y. Guo, Q. Niu, D.E. Levy, J.A. Dyck, S. Lu, L.A. Sheiman, and Y. Liu, *Proto-oncogene PML controls genes devoted to MHC class I antigen presentation*. *Nature*, 1998. **396**(6709): p. 373-6.
479. Mori, N., M. Fujii, G. Cheng, S. Ikeda, Y. Yamasaki, Y. Yamada, M. Tomonaga, and N. Yamamoto, *Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways*. *Virus Genes*, 2001. **22**(3): p. 279-87.
480. Wolf, D., V. Witte, B. Laffert, K. Blume, E. Stromer, S. Trapp, P. d'Aloja, A. Schürmann, and A. Baur, *HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals*. *Nat Med*, 2001. **7**(11): p. 1217-24.
481. Munger, J. and B. Roizman, *The US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10410-5.
482. Tewari, M. and V. Dixit, *Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(7): p. 3255-60.
483. Wolff, S., S. Becker, and A. Groseth, *Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy-function to inhibit the induction of apoptosis during infection*. *J Virol*, 2012. (doi: 10.1128/JVI.01929-12).
484. Tollefson, A., T. Hermiston, D. Lichtenstein, C. Colle, R. Tripp, T. Dimitrov, Toth K, C. Wells, P. Doherty, and W. Wold, *Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells*. *Nature*, 1998. **392**(6677): p. 726-30.
485. Mérino, D., N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, and O. Micheau, *Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(19): p. 7046-55.
486. Bavari, S., C. Bosio, E. Wiegand, G. Ruthel, A. Will, T. Geisbert, M. Hevey, C. Schmaljohn, A. Schmaljohn, and M. Aman, *Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses*. *J Exp Med*, 2002. **195**(5): p. 593-602.

Annexes

Les communications écrites concernant directement le sujet de thèse les suivantes.

⇒ **Russier M, Pannetier D, Baize S.** Immune responses and Lassa virus infection. *Viruses*, 2012, 4(11):2766-85. Revue.

⇒ **Russier M, Reynard S, Tordo N, Baize S.** NK cells are strongly activated by Lassa and Mopeia virus-infected human macrophages *in vitro*, but do not mediate virus suppression. *Eur J Immunol*, 2012, 42(7):1822-32.

Cet article est reproduit ci-après

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201142099/full>

