



**HAL**  
open science

# Étude in vitro et ex vivo de la réponse des cellules dendritiques à l'infection par le virus Lassa

Justine Schaeffer

► **To cite this version:**

Justine Schaeffer. Étude in vitro et ex vivo de la réponse des cellules dendritiques à l'infection par le virus Lassa. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1249 . tel-02021149

**HAL Id: tel-02021149**

**<https://theses.hal.science/tel-02021149>**

Submitted on 15 Feb 2019

**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.



N° d'ordre NNT : 2018LYO111518460

## THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de  
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED340  
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Virologie  
Discipline : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 20/11/2018, par :  
**Justine Schaeffer**

---

# Étude *in vitro* et *ex vivo* de la réponse des cellules dendritiques à l'infection par le virus Lassa

---

Devant le jury composé de :

Christine Delprat, Professeure, UCBL

Présidente

Stefan Kunz, Professeur, Université de Lausanne

Rapporteur

Vincent Vieillard, Directeur de Recherche, UPMC

Rapporteur

Marlène Dreux, Chargée de Recherche, INSERM

Examinatrice

Nolwenn Jouvenet, Chargée de Recherche, Institut Pasteur

Examinatrice

Sylvain Baize, Directeur de Recherche, Institut Pasteur

Directeur de thèse

# Résumé

---

Le virus Lassa (LASV) induit une fièvre hémorragique chez l'homme et est responsable de 3 000 à 5 000 décès par an. Aucun vaccin ou traitement efficace contre LASV n'est disponible, et les mécanismes de pathogenèse de la fièvre de Lassa sont encore mal compris. Des études chez l'homme et le primate suggèrent que la réponse interféron de type I (IFN-I) et de la réponse T sont critiques pour la survie de l'hôte. Nous nous sommes intéressés à la réponse des cellules dendritiques (DC) à LASV, car elles peuvent à la fois produire des IFN-I et induire la réponse T. Nous avons étudié les DC plasmacytoïdes (pDC), spécialisées dans la réponse IFN-I, et les DC myéloïdes (mDC), présentatrices d'antigènes. Nous avons montré que les pDC et les mDC ne sont pas productivement infectées par MOPV et LASV. Les pDC produisent des quantités importantes d'IFN-I en réponse à MOPV, mais pas à LASV. Les mDC sont activées et produisent des IFN-I en réponse à MOPV mais aussi à LASV. Cependant, seules les mDC infectées par MOPV sont capables d'activer des lymphocytes T. De plus, la présence de lymphocytes T inhibe complètement l'activation des mDC infectées par LASV. Ces différences entre les mDC infectées par MOPV et LASV dépendent de la nucléoprotéine de LASV, qui est connue pour ses propriétés immunosuppressives, mais aussi de la glycoprotéine. En résumé, nous avons obtenu des différences de réponse à l'infection par MOPV ou LASV chez les pDC et les mDC. Ces cellules pourraient avoir un rôle essentiel *in vivo* dans la réponse globale à LASV, et donc dans l'issue de la fièvre de Lassa.

**Mots-clefs :** virus Lassa ; fièvre hémorragique virale ; réponse immunitaire ; cellules dendritiques ; myéloïdes ; plasmacytoïdes ; interféron de type I ; lymphocytes T

**Laboratoire d'accueil :**

Unité de Biologie des Infections Virales Émergentes  
Institut Pasteur  
21 avenue Tony Garnier  
69007 Lyon

## *Ex vivo* and *in vitro* study of dendritic cell response to Lassa virus

Lassa virus (LASV) is responsible for a viral haemorrhagic fever in humans and the death of 3,000 to 5,000 people every year. There is currently no vaccine or treatment available against LASV, and its pathogenesis is not completely understood yet. According to studies on humans and primates, type I interferon (IFN-I) and T cell responses appear to be critical for the host. We studied the response of dendritic cells (DC) to LASV, as DC are involved in both IFN-I production and T cell activation. We compared the response of primary human DC to LASV and Mopeia virus (MOPV), which is similar to LASV, but non-pathogenic. We focused on plasmacytoid DC (pDC), specialized in IFN-I production, and myeloid DC (mDC), specialized in antigen presentation. We showed that neither pDC nor mDC were productively infected by LASV and MOPV. pDC infected with MOPV produced large amounts of IFN-I, whereas pDC infected with LASV did not. mDC produced substantial amounts of IFN-I in response to both LASV and MOPV. However, only MOPV-infected mDC were able to activate T cells. More surprisingly, coculture with T cells completely inhibited the activation of LASV-infected mDC. These differences between LASV- and MOPV-infected mDC were mostly due to LASV nucleoprotein, which has major immunosuppressive properties, but the glycoprotein was also involved. Overall, these results showed differences in pDC and mDC response to MOPV and LASV. Therefore, both pDC and mDC may be important for the global response to LASV *in vivo*, and play a role in the outcome of Lassa fever.

**Keywords :** Lassa virus ; viral hemorrhagic fever ; immune response ; dendritic cells ; myeloid ; plasmacytoid ; type I interferon ; T cells

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps pour évaluer mon travail. J'espère être à la hauteur. Merci à mes deux rapporteurs, Vincent Vieillard et Stefan Kunz, qui avaient la lourde tâche de corriger mon manuscrit. Merci à Christine Delprat d'avoir accepté de présider ce jury. Et merci à Nolwenn Jouvenet et Marlène Dreux, non seulement pour leur participation au jury de thèse, mais aussi pour leur investissement dans mon comité de suivi de thèse. Nos rencontres annuelles ont été très importantes pour moi, et vos conseils très précieux.

Cette thèse n'aurait bien sûr pas été possible sans Sylvain Baize, mon directeur. J'espère que tu n'as pas regretté ton choix après m'avoir accepté en stage de M2. Merci de m'avoir fait confiance et accordé la liberté de mener ce projet à ma manière, j'avais besoin de cette autonomie. Et ce tout en étant disponible quand j'en avais besoin. Cet équilibre entre indépendance et soutien n'étais pas forcément évident à trouver, pourtant je n'ai jamais eu l'impression de manquer ni de l'un ni de l'autre. Et surtout, je ne te remercierai jamais assez de l'opportunité que tu m'as donné de partir sur le terrain. Je n'exagère pas quand je dis que ces deux missions en Guinée ont changé ma vie.

Je remercie aussi tous les membres de l'UBIVE, passés ou présents. Ceux qui sont restés plus ou moins longtemps avec nous, et qui ont participé à la richesse et à la bonne ambiance de l'équipe. Un merci particulier à Nelly, membre fondateur du club des pioupious, à Héloïse, qui nous a quitté pour rejoindre les caribous, et à Sophie, à qui je souhaite plein de bonheur avec son petit bout de chou. Aux nouveaux (ou presque) thésards, Othmann et Jimmy, je vous souhaite bonne chance pour la suite, même si je ne suis pas inquiète. Vous voyez, on peut faire une thèse hyper sereinement ! Caro, merci pour les pauses à rallonge quand aucune de nous n'avait envie de travailler. Xavier, je te râle dessus parfois (et tu me le rends bien), mais tu as répondu présent chaque fois que j'en avais besoin, et je te dois beaucoup. Les chocobons sur mon bureau m'ont beaucoup aidé à survivre à mes nombreuses nocturnes ! Mathieu, tu es un peu le réservoir à bonne humeur de ce labo. Merci pour tes précieux conseils dans à peu près tous les domaines, tes blagues plus ou moins subtiles mais toujours drôles, et les séances bière/babyfoot au foyer. Béa, sans toi je n'en serai pas là, au sens littéral comme au figuré. J'ai pris l'habitude de venir te voir dès que j'avais le moindre problème, et je ne sais pas comment je vais faire que je serai partie... On est tous un peu tes enfants, et si parfois on te tape sur les nerfs, on sait qu'au fond tu nous aimes quand même ! Alex et Damien, heureusement que votre bureau était à côté du mien... Damien, merci pour nos conversations à 8h quand il n'y avait personne, nos coup de gueule sur un monde

qui va mal, nos échanges de livres pour s'en échapper. Tu es une personne en or et tu mérites tout le bonheur du monde. Alex, quand je serai grande, je veux être comme toi. Avec ton franc parler légendaire, ton optimiste, ton soutient indéfectible, tu es prête à défendre ce en quoi tu crois et tu as le cœur sur la main. Tu m'as apporté beaucoup et je ne te souhaite que le meilleur. Stéphanie, tu as une place toute particulière dans ces remerciements. Comme celle que tu as occupé pendant mes 5 années à l'UBIVE. Je te dois tout. Comment pourrait-il en être autrement, tu donnes tellement de toi dans tout ce que tu fais. Tu as fait de moi une meilleure scientifique et une meilleure personne. Tu es bourrée de qualités à ne plus savoir quoi en faire, ne doutes jamais de ce que tu vaux. Enfin, Nicolas. Tu as vu, tu es cité en dernier. Dire que mon séjour au labo n'aurait pas été pareil sans toi est un doux euphémisme. D'un autre côté, quand on est coincés ensemble dans un bureau de 2 m<sup>2</sup>, forcément... Bizarrement, tes coups de blues m'ont forcé à rester optimiste, comme si il fallait que je compense. Je ne citerai pas tout ce qu'on a partagé, la liste serait trop longue. Je préfère te donner un dernier conseil : tu es une personne formidable, ne remets jamais ça en doute. Il est temps de soigner ton syndrome Calimero ! Tu es intelligent, drôle, sympa, ouvert d'esprit, investit dans ce que tu fais, toujours là pour tes amis, et j'en passe. J'espère que tous ces compliments t'aideront à regonfler un peu ton ego et de mener ta vie comme tu l'entends, sans te poser toutes ces questions. Je te souhaite juste d'être heureux.

Tous ceux qui ont croisé mon chemin pendant ces 5 dernières années, vous avez aussi toute ma gratitude. Le membres du CIRI, en particuliers ceux du comité d'organisation de la retraite 2018, avec qui j'ai passé de très bon moments. Nos voisins du 3e, Olivier qui est un membre adopté de l'UBIVE, et Nicolas qui a presque élu domicile dans notre bureau. Natalia et Maris-Agnès, qui m'ont initié au monde nébuleux de la bioinformatique. Et bien sûr les gens du P4, que j'ai finalement côtoyé presque autant que les ubiviens, pour leur plus grand malheur. Merci Christophe pour avoir supporté mes changements de planning, mes annulations de manip et mes horaires étranges, il y en a eu beaucoup... Merci à Delphine et Stéphane pour la formation. Merci au reste de l'équipe biosec, Alban, Béatrice, Caroline et Hervé, qui font tourner ce labo, et on sait comme c'est compliqué. Merci à tous les autres, Anne, Damien, Sabine, Elodie, Steph, Steph et Steph (à vous de déterminer qui est qui), Aurélie, Audrey et Laura, que j'ai embêté bien trop souvent avec ma GDS, mes inactivations, mes accompagnements, ... Et qui ne me l'ont jamais fait payer ! Et merci aux membres des autres équipes utilisatrices, qui ont rendu mes heures d'incub un peu moins longues. Les contraintes du P4 sont beaucoup plus faciles à vivre quand on y entre avec des gens sympa !

En dehors du labo aussi j'ai côtoyé des gens incroyables. Les filles de la danse, pour les jeudis soirs qui allègent ma semaine et les sorties supplémentaires. La team des doctoriales, pour la fin de thèse qu'on a traversé ensemble et la suite qui se profile devant nous. Céline et Nico, pour les nombreux week-ends où on a squatté votre terrasse/salon (selon le temps). Les amis, de la primaire à prépa, que je suis toujours heureuse de retrouver même si ce n'est pas assez souvent. Les Nancéens, qui font que

les 8h de route jusqu'en Lorraine valent toujours le coup. Et les bonhommes de Paris (Toto je t'ai piqué ta formule, c'est un hommage!), qui sont de moins en moins à Paris mais toujours aussi géniaux. Chaque fois qu'on se revoit j'ai l'impression qu'on ne s'est jamais quitté, et j'espère que ça restera comme ça le plus longtemps possible!

Pour finir, j'ai eu la chance de grandir dans une famille formidable. Ça aide dans la vie. Merci à mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines, c'est à cause de vous que Noël reste mon jour préféré de l'année. Margot et Mathieu, j'ai eu de la chance de vous avoir. Je sais que ce n'est pas forcément facile de m'avoir comme sœur, pour diverses raisons. Vous êtes tous les deux devenus des adultes formidables, et la vie vous tends les bras. Je sais que je n'y suis pour rien, mais je ne peux pas m'empêcher d'être fière de vous! Papa et maman, vous nous avez souvent dit que les enfants ne doivent rien à leurs parents. Pourtant, la manière dont vous nous avez élevé a façonné la personne que je suis aujourd'hui. Grâce à vous, je suis globalement un adulte équilibré (avec quelques petites névroses, mais bon, qui n'en a pas?). Et surtout je suis heureuse, c'est la plus belle illustration de votre réussite. Pierre, je t'ai déjà tout dit, mais c'est l'occasion de le graver dans le papier (à défaut d'avoir du marbre). Je ne crois pas au concept "l'homme de ma vie", pourtant c'est la première chose qui me vient pour te définir. Pas tant pour l'avenir de notre couple que pour ce que tu m'as déjà apporté. Tu as cru en moi, bien plus que moi d'ailleurs, et tu as aidé l'adolescente timide que j'étais à gagner en confiance, en détermination, en courage et en ambition. Tu es la définition même de l'altruisme, et ça me pousse à m'améliorer. Tu m'as aidé à bâtir une version de moi-même dont je suis fière, et tu me donnes envie de faire encore mieux. Pour tout ça, pour tout le reste, et pour ce qu'on va encore partager, merci.

# Table des matières

---

Résumé . . . . .	1
Summary . . . . .	2
Remerciements . . . . .	3
Table des matières . . . . .	8
Liste des figures . . . . .	10
Liste des tableaux . . . . .	11
Liste des abréviations . . . . .	12
<b>1 Introduction</b>	<b>15</b>
1 La fièvre de Lassa . . . . .	15
1.1 Épidémiologie . . . . .	15
1.2 Physiopathologie . . . . .	19
1.3 Modèle de la pathogenèse de LASF . . . . .	22
1.4 Diagnostic, traitement et prophylaxie . . . . .	24
1.4.1 Diagnostic . . . . .	24
1.4.2 Prophylaxie . . . . .	26
1.4.3 Traitements . . . . .	27
2 Biologie cellulaire et moléculaire des Arénavirus . . . . .	29
2.1 Phylogénie . . . . .	29
2.2 Structure et cycle viral . . . . .	31
2.2.1 Virions . . . . .	31
2.2.2 Génome et stratégie de réplication . . . . .	32
2.2.3 Cycle viral . . . . .	34
2.3 Propriétés des protéines virales . . . . .	37
2.3.1 Glycoprotéine GP . . . . .	37
2.3.2 Nucléoprotéine NP . . . . .	39
2.3.3 Protéine de matrice Z . . . . .	42
2.3.4 ARN-polymérase ARN-dépendante L . . . . .	44
3 Réponse immune aux Arénavirus . . . . .	47
3.1 Moyens d'étude . . . . .	47
3.1.1 Études <i>in vitro</i> . . . . .	47
3.1.2 Modèles animaux . . . . .	48
3.1.3 Modèles de comparaison . . . . .	51
3.2 Réponse immunitaire innée . . . . .	52
3.2.1 Cytokines, chémokines et IFN . . . . .	52
3.2.2 Cellules Natural Killer . . . . .	54

3.2.3	Cellules Présentatrices d'Antigènes . . . . .	55
3.3	Réponse immunitaire adaptative . . . . .	57
3.3.1	Réponse humorale . . . . .	57
3.3.2	Réponse T . . . . .	57
3.4	Inhibition de la réponse immunitaire par les Arénavirus . . . . .	59
4	Cellules dendritiques . . . . .	61
4.1	Caractéristiques des DC . . . . .	61
4.2	Cellules dendritiques myéloïdes . . . . .	64
4.3	Cellules dendritiques plasmacytoïdes . . . . .	66
5	Problématique : intérêt de l'étude des pDC et mDC lors de l'infection par LASV . . . . .	68
<b>2</b>	<b>Résultats</b>	<b>72</b>
1	Réponse antivirale innée : infection des cellules dendritiques plasmacy- toïdes par LASV . . . . .	72
1.1	Infection des pDC par MOPV et LASV . . . . .	72
1.1.1	Infection par des particules infectieuses . . . . .	72
1.1.2	Infection au contact de cellules infectées . . . . .	73
1.2	Réponse IFN-I des pDC à MOPV et LASV . . . . .	75
1.3	Activation des pDC par MOPV et LASV . . . . .	77
1.3.1	Marqueurs membranaires . . . . .	77
1.3.2	Molécules sécrétées . . . . .	77
1.3.3	État transcriptionnel . . . . .	80
2	Détection et présentation d'antigènes : activation des cellules dendri- tiques myéloïdes par LASV . . . . .	84
2.1	Réponse IFN-I des mDC à MOPV et LASV . . . . .	84
2.2	Infection des mDC par MOPV et LASV . . . . .	85
2.2.1	Permissivité des mDC à l'infection . . . . .	85
2.2.2	Contrôle de l'infection par la réponse IFN-I . . . . .	86
2.3	Activation des mDC par MOPV et LASV . . . . .	88
2.3.1	Marqueurs membranaires . . . . .	88
2.3.2	Molécules sécrétées . . . . .	90
2.3.3	État transcriptionnel . . . . .	91
3	Initiation de la réponse adaptative : activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques myéloïdes infectées . . . . .	95
3.1	Modèle de coculture mDC-T . . . . .	95
3.2	Activation des LT en coculture . . . . .	96
3.3	Réponse des mDC en coculture avec des LT . . . . .	99
3.3.1	Réponse IFN-I . . . . .	99
3.3.2	Marqueurs d'activation . . . . .	100
3.3.3	Facteurs solubles impliqués dans le dialogue mDC/LT . . . . .	102

3.4	Rôles des différentes protéines virales dans l'immunogénicité de MOPV et LASV . . . . .	102
3.4.1	Virus chimères . . . . .	102
3.4.2	Réponse des LT . . . . .	105
3.4.3	Réponse des mDC . . . . .	107
<b>3</b>	<b>Discussion</b>	<b>109</b>
1	Réponse des cellules dendritiques plasmacytoïdes à LASV . . . . .	110
2	Réponse des cellules dendritiques myéloïdes à LASV . . . . .	114
3	Initiation de la réponse T par les cellules dendritiques myéloïdes . . . . .	116
4	Conclusion et perspectives . . . . .	119
<b>4</b>	<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>121</b>
1	Matériel biologique . . . . .	121
1.1	Cellules et virus sauvages . . . . .	121
1.2	Virus OGM . . . . .	121
2	Culture et purification de cellules primaires . . . . .	124
2.1	Purification des PBMC . . . . .	124
2.2	Purification des pDC . . . . .	125
2.3	Purification des mDC . . . . .	125
2.4	Cocultures mDC-LT . . . . .	125
2.5	Neutralisation des IFN-I . . . . .	126
3	Acides nucléiques . . . . .	126
3.1	Extractions d'ARN . . . . .	126
3.2	Quantification des ARN viraux par RT-qPCR . . . . .	127
3.3	Quantification des ARNm cellulaires par RT-qPCR . . . . .	128
3.4	Transcriptomique . . . . .	129
4	Cytométrie en flux . . . . .	131
4.1	Infection des pDC . . . . .	131
4.2	Activation des mDC . . . . .	133
4.3	Activation des LT . . . . .	134
5	Quantification de cytokines par Luminex . . . . .	134
6	Graphes et statistiques . . . . .	135
	<b>Bibliographie</b>	<b>137</b>
	<b>Annexes</b>	<b>157</b>

# Liste des Figures

---

1.1	Distribution spatiale et temporelle des cas de LASF . . . . .	16
1.2	<i>Mastomys natalensis</i> . . . . .	18
1.3	Dommages tissulaires associés à LASF . . . . .	21
1.4	Modèle de pathogenèse de la fièvre de Lassa . . . . .	23
1.5	Distribution géographique des Arénavirus pathogènes pour l'homme . . . . .	29
1.6	Classification phylogénétique des <i>Mammarenaviridae</i> . . . . .	30
1.7	Structure de la particule virale des Arénavirus . . . . .	32
1.8	Réplication du génome des Arénavirus . . . . .	33
1.9	Cycle virale de LASV . . . . .	35
1.10	Structure de la glycoprotéine . . . . .	38
1.11	Structure de la nucléoprotéine de LASV . . . . .	40
1.12	Modèle d'interaction avec l'ARN et de multimérisation de la NP . . . . .	41
1.13	Structure de la protéine Z . . . . .	42
1.14	Structure de la protéine L . . . . .	45
1.15	Cytokines chez les PNH infectés par LASV . . . . .	53
1.16	Évènements immunologiques au cours de LASF . . . . .	58
1.17	Inhibition de la réponse immunitaire par les Arénavirus . . . . .	59
1.18	Différenciation des cellules dendritiques . . . . .	61
1.19	Phénotypage des population de DC humaines . . . . .	65
1.20	Réponse IFN-I dans les pDC . . . . .	66
1.21	Intérêt de l'étude des mDC et pDC lors de l'infection par LASV . . . . .	70
2.1	L'infection des pDC par MOPV et LASV n'est pas productive . . . . .	73
2.2	MOPV et LASV sont détectés dans les pDC au contact de cellules infectées . . . . .	74
2.3	Réponse IFN-I des pDC à MOPV et LASV . . . . .	76
2.4	Régulation des marqueurs d'activation des pDC en réponse à MOPV et LASV . . . . .	78
2.5	Cytokines produites par les pDC en réponse à MOPV et LASV . . . . .	79
2.6	Régulation des gènes des pDC lors de l'infection par MOPV et LASV . . . . .	81
2.7	Voies régulées chez les pDC lors de l'infection par MOPV et LASV . . . . .	83
2.8	MOPV et LASV induisent la production d'IFN-I par les mDC . . . . .	84
2.9	Production de particules infectieuses par les mDC infectées par MOPV et LASV . . . . .	86
2.10	Infection des mDC par MOPV et LASV fluorescents . . . . .	87
2.11	Les mDC expriment des marqueurs cellulaires d'activation en réponse à MOPV et LASV . . . . .	88

2.12	Illustration de l'activation des mDC quantifiée par cytométrie en flux . . . . .	89
2.13	Cytokines produites par les mDC en réponse à MOPV et LASV . . . . .	90
2.14	Régulation transcriptomique des mDC lors de l'infection par MOPV et LASV . . . . .	92
2.15	Les gènes modulés par MOPV et LASV impactent l'état d'activation global des mDC . . . . .	93
2.16	Protocole de coculture mDC/LT . . . . .	95
2.17	Les mDC infectées par MOPV, mais pas celles infectées par LASV, activent les LT en coculture . . . . .	97
2.18	Illustration de l'activation des LT en coculture . . . . .	98
2.19	Seules les mDC infectées par MOPV produisent des IFN-I en coculture	99
2.20	Les mDC infectées par MOPV, mais pas celles infectées par LASV, sont activées en coculture avec des LT . . . . .	100
2.21	Quantification de médiateurs potentiels du dialogue mDC/LT . . . . .	101
2.22	Production de virus chimériques MOPV/LASV . . . . .	103
2.23	Réplication des virus chimères en coculture mDC-T . . . . .	104
2.24	Activation des LT en coculture : virus chimères . . . . .	106
2.25	Réponse des mDC en coculture : virus chimères . . . . .	107
4.1	Principe de la génétique inverse . . . . .	122
4.2	Standard ARN pour la RT-qPCR MOPV . . . . .	127
4.3	Qualité des analyses de transcriptomiques . . . . .	130
4.4	Populations cellulaires par cytométrie en flux . . . . .	133
4.5	Technique du luminex . . . . .	135

# Liste des tableaux

---

1.1	Principales manifestations cliniques de LASF . . . . .	20
1.2	Techniques de diagnostic de LASV . . . . .	25
1.3	Modèles animaux de LASF . . . . .	49
1.4	Sous-types de DC . . . . .	63
4.1	Primers utilisés pour les virus chimères . . . . .	123
4.2	Primers utilisés pour les qPCR . . . . .	128
4.3	Cytomètres en flux . . . . .	131
4.4	Anticorps de cytométrie . . . . .	132
4.5	Analytes testés en luminex . . . . .	136

# Liste des abréviations

---

<b>AANE</b>	acides aminés non-essentiels
<b>Ac</b>	anticorps
<b><math>\alpha</math>DG</b>	alpha-dystroglycan
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>Ag</b>	antigène
<b>ALT</b>	alanine aminotransférase
<b>ARNdb</b>	ARN double-brin
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARNpol</b>	ARN-polymérase
<b>AST</b>	aspartate aminotransférase
<b>ATB</b>	antibiotiques (pénicilline/streptomycine)
<b>CCHF</b>	fièvre hémorragique de Crimée-Congo
<b>CDC</b>	Center for Disease Control
<b>CDP</b>	progéniteurs de cellules dendritiques
<b>CMC</b>	carboxy-methyl-cellulose
<b>CMH</b>	complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	cellule présentatrice d'antigène
<b>DC</b>	cellule dendritique
<b>DCL</b>	cellule de Langerhans
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EdN</b>	endonucléase
<b>EFS</b>	Établissement Français du sang
<b>ES</b>	erreur standard
<b>ExN</b>	exonucléase
<b>FC</b>	fold change
<b>FHA</b>	fièvre hémorragique à Arénavirus
<b>FHV</b>	fièvre hémorragique virale
<b>GAIV</b>	virus Gairo
<b>GP</b>	glycoprotéine
<b>GTOV</b>	virus Guanarito
<b>HA</b>	hémagglutinine
<b>HBV</b>	virus de l'hépatite B

<b>HCV</b>	virus de l'hépatite C
<b>HIV</b>	virus de l'immunodéficience humaine (Human Immunodeficiency Virus)
<b>HSC</b>	cellule souche hématopoïétique (hematopoietic stem cells)
<b>IFN</b>	interféron
<b>IFN-I</b>	interféron de type I
<b>IFNAR</b>	récepteurs à l'interféron $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
<b>IFA</b>	immunofluorescence assay
<b>IGR</b>	région intergénique
<b>IGRS</b>	région intergénique du segment S
<b>IPA</b>	Ingenuity Pathway Analysis
<b>ISG</b>	gène stimulé par l'interféron (interferon-stimulated gene)
<b>JUNV</b>	virus Junin
<b>L</b>	ARN polymérase ARN-dépendante
<b>LDH</b>	lactate deshydrogénase
<b>LASF</b>	fièvre de Lassa
<b>LASV</b>	virus Lassa
<b>LASV-mCh</b>	virus Lassa exprimant la mCherry
<b>LCMV</b>	virus de la chorioméningite lymphocytaire
<b>LT</b>	lymphocyte T
<b>LUJV</b>	virus Lujo
<b>MACV</b>	virus Machupo
<b>mDC</b>	cellule dendritique myéloïde
<b>MEC</b>	matrice extracellulaire
<b>MET</b>	microscopie électronique à transmission
<b>moDC</b>	cellule dendritique dérivée de monocyte (monocyte-derived dendritic cell)
<b>MOI</b>	multiplicité d'infection
<b>MOPV</b>	virus Mopeia
<b>MOPV-mCh</b>	virus Mopeia exprimant la mCherry
<b>MORV</b>	virus Morogoro
<b>MOT</b>	micro-organisme et toxine
<b>MP</b>	macrophage
<b>MRU</b>	Mano River Union
<b>MVB</b>	multivesicular bodies
<b>NP</b>	nucléoprotéine
<b>OGM</b>	organisme génétiquement modifié
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORF</b>	cadre de lecture (open reading frame)

<b>Pauto</b>	plasma autologue
<b>PBL</b>	lymphocytes du sang périphérique (Peripheral Blood Lymphocytes)
<b>PBMC</b>	cellules mononucléées du sang périphérique
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>pDC</b>	cellule dendritique plasmacytoïde
<b>PFA</b>	paraformaldéhyde
<b>p.i</b>	post-infection
<b>pIC</b>	polyI :C
<b>PICV</b>	virus Pichinde
<b>PNH</b>	primate non-humain
<b>Ppool</b>	pool de plasma humain
<b>p.s</b>	post-symptômes
<b>RE</b>	réticulum endoplasmique
<b>RLR</b>	RIG-I-like Receptor
<b>RNP</b>	ribonucléoprotéine
<b>SABV</b>	virus Sabia
<b>SVF</b>	sérum de veau foetal
<b>TACV</b>	virus Tacaribe
<b>TfR1</b>	récepteur à la tranferine 1
<b>UFF</b>	unité formant foyer
<b>VLP</b>	particules pseudo-virales (virus-like particles)
<b>VSV</b>	virus de la stomatite vésiculeuse
<b>WWAV</b>	virus White Water Arroyo
<b>YFV</b>	virus de la fièvre jaune (Yellow Fever Virus)
<b>Z</b>	protéine de matrice

## 1 La fièvre de Lassa

### 1.1 Épidémiologie

**Historique** En 1969, un virus inconnu provoque à Jos, au Nigeria, une grave fièvre hémorragique chez trois infirmières et la mort de deux d'entre elles [63]. Cette maladie avait déjà été décrite au Sierra Leone dans les années 1950. Elle est nommée fièvre de Lassa (LASF) en référence au village d'origine de la première infirmière. Des prélèvements de patients (dont sérum et urine) ont permis l'isolement d'un virus : le virus Lassa (LASV).

Ce virus ne se réplique pas en cellules de moustiques, mais infecte les souris chez qui il se comporte de manière similaire au virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV). Il est sérologiquement proche de LCMV et du virus Tacaribe (TACV). Les techniques *in vitro* de l'époque suggèrent que LASV est sphérique, fait 70 à 150 nm, possède une enveloppe lipidique et un génome ARN [27].

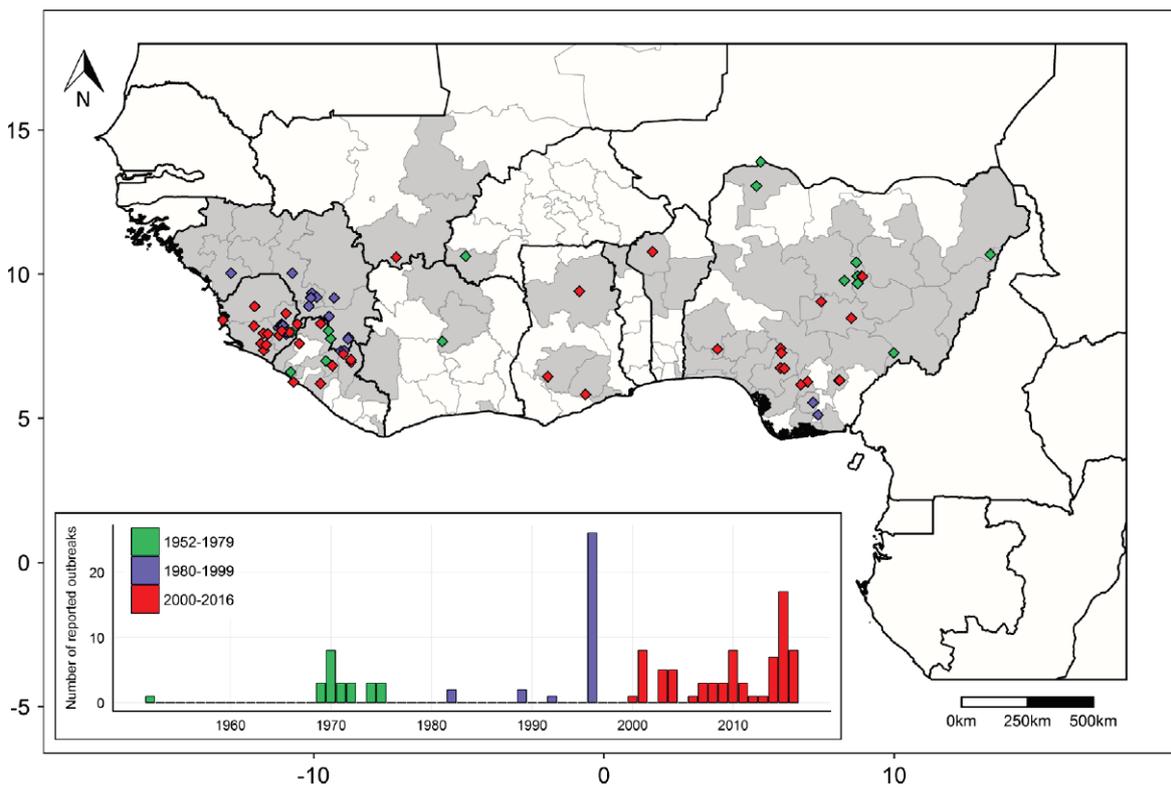
Lors de cette première épidémie référencée de LASF, 28 cas ont été recensés en un mois sur le plateau de Jos. 24 sont des personnels ou des patients de l'hôpital de Jos, et les 4 autres font partie de la famille des patients. 13 patients sont décédés des suites de la maladie [33]. Deux techniciens de laboratoire américains, ayant travaillé sur l'identification de LASV, se sont contaminés en laboratoire et l'un d'eux est décédé [107]. Depuis, des épidémies de LASF ont été décrites au Nigeria, au Liberia, au Sierra Leone, en Guinée, au Mali et au Sénégal [148]. Des cas importés ont aussi été répertoriés dans le monde entier.

**Situation actuelle** LASV est endémique en Afrique de l'ouest, avec des flambées épidémiques (Figure 1.1). La dernière en date a touché 450 personnes au Nigeria en janvier 2018, dont 43 sont décédées [216]. On estime que LASV infecte 300 000 à 500 000 personnes chaque année et provoque 5 000 à 6 000 décès [148]. Mais comme 80% des infections par LASV sont asymptomatiques et que la surveillance dans les pays endémiques est limitée, ces chiffres sont approximatifs. La séroprévalence de LASV (7% en Guinée, 15-20% en Sierra Leone et au Liberia, plus de 20% au Nigeria) suggère que l'incidence et la distribution spatiale de LASF sont sous-estimées (Figure 1.1).

Le taux de mortalité global de LASF est de 3 à 5% mais il est souvent plus important lors des flambées épidémiques (34% pour l'épidémie de 2016 au Nigeria [123]).

Dans 20% des cas, les patients développent une forme sévère de LASF, et le taux de mortalité atteint 15 à 20% chez les patients hospitalisés [216]. Les personnes qui ne pas originaires des régions endémiques (touristes, expatriés) sont aussi plus susceptibles à LASF [148]. Chez la femme enceinte, l'infection par LASV provoque la mort du fœtus dans 75% (3<sup>eme</sup> trimestre) à 92% (1<sup>er</sup> trimestre) des cas, et la mort de la mère dans 7% (1<sup>er</sup> trimestre) à 50 % (dernier mois) des cas [165].

**Réservoir** Lors de l'épidémie de septembre-octobre 1972 en Sierra Leone, des scientifiques du CDC (Center for Disease Control) ont collecté des échantillons de chauve-souris et de rongeurs. 14 de ces échantillons ont permis d'isoler LASV, et tous provenaient de rongeurs *Mastomys natalensis*. Dans les maisons abritant des patients atteints de LASF, la prévalence de LASV parmi les *M. natalensis* testés était particulièrement élevée. Ces données ont permis d'identifier *M. natalensis* comme réservoir de LASV [141]. *M. natalensis* est un rongeur africain présent dans toute l'Afrique subsaharienne. C'est une espèce commensale de l'homme, qui vit uniquement dans les



**FIGURE 1.1: Distribution spatiale et temporelle des cas de LASF**

Chaque point représente un cluster de cas humains de LASF (suspects et confirmés) recensés entre 1952 et 2016 (n=102). Ces clusters ont été identifiés dans des publications scientifiques ou des rapports de surveillances. Les zones grisées indiquent les régions administratives où LASV a été isolé chez l'homme ou chez le rongeur. La distribution annuelle des clusters de LASF est indiquée par l'histogramme présent sous la carte. Issu de [68]

zones rurales habitées. Il existe différents sous-types de *M. natalensis* selon les régions d’Afrique (Figure 1.2A).

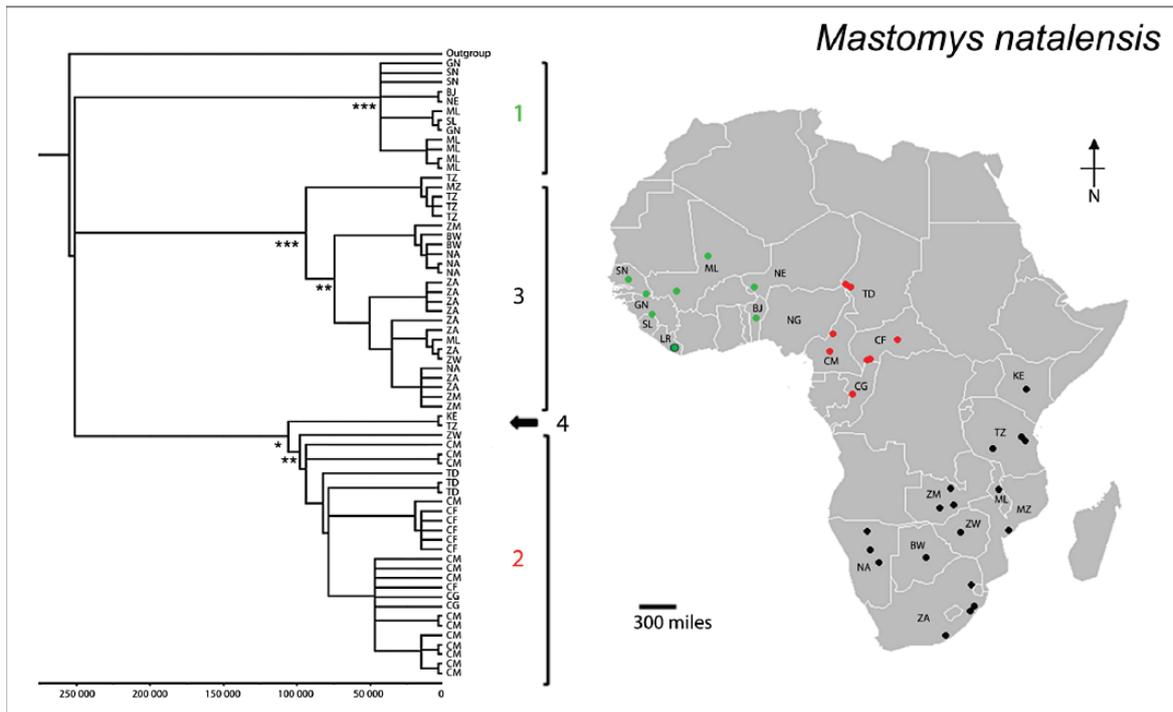
Mis à part LASV, *M. natalensis* est le réservoir de 4 Arénavirus de l’ancien monde : Morogoro (MORV, Tanzanie), Mopeia (MOPV, Mozambique), Gairo (GAIV, Tanzanie) et Luna (Zambie) [151]. Le portage de ces différents virus semble varier selon les sous-types de *M. natalensis* : en Tanzanie, il existe une importante ségrégation spatiale entre MORV et GAIV, alors que les populations de *M. natalensis* sont continues. Il semblerait que MORV et GAIV soient chacun associé à un sous-clade différent de *M. natalensis*, et qu’une co-évolution virus/hôte ait rendu impossible la diffusion du virus en dehors de ce sous-clade [73]. Les populations de *M. natalensis* d’Afrique de l’ouest forment un clade distinct du reste du continent. Les cas autochtones d’infection par LASV sont restreints à l’Afrique de l’ouest, ce qui suggère une spécificité virus/hôte et une co-évolution entre LASV et le clade d’Afrique de l’ouest de *M. natalensis*. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l’influence de facteurs géographiques (barrières dans la dispersion des rongeurs contaminés) ou biologiques (résistance à l’infection ou co-infection par d’autres Arénavirus) sur la distribution spatiale de LASV [68]. Récemment, LASV a été isolé chez d’autres espèces de rongeurs : *Hylomyscus pamfi* au Nigeria et *Mastomys erythroleucus* au Nigeria et en Guinée. Des *M. erythroleucus* séropositifs pour LASV ont été trouvés dans des zones caractérisées par une séroprévalence de LASV chez l’homme et une absence de *M. natalensis*, suggérant une transmission zoonotique de LASV depuis *M. erythroleucus* vers l’homme. Ces hôtes pourraient redéfinir les limites géographiques de la zone d’endémie de LASV [150].

**Transmission** La capture de *M.natalensis* sauvages n’a pas montré de différences significatives entre les individus porteurs de LASV et les autres, suggérant un portage sain du virus [126]. Cette absence de symptôme a été confirmée en laboratoire avec l’infection par LASV de *M.natalensis* nouveau-nés [209]. Les dynamiques d’infection de *M. natalensis* suggèrent que la transmission de LASV entre les rongeurs se fait majoritairement de manière horizontale [168]. Les comportements sexuels des rongeurs semblent être impliqués. La transmission horizontale est suivie d’une excrétion transitoire du virus par l’urine, la salive, les sécrétions respiratoires et le sang [134]. Une transmission verticale est aussi possible : les individus nés d’une mère infectée par LASV développent une infection chronique et excrètent du virus en continu [60]. Ces individus pourraient contribuer à la persistance de LASV dans les populations de rongeurs.

Même si ça n’a jamais été démontré, il est communément admis que la transmission de LASV du rongeur à l’homme se fait par inhalation, contact ou ingestion d’excréments de rongeurs infectés [134]. L’efficacité de transmission par ces différentes voies est encore inconnue. *M.natalensis* vivant préférentiellement dans les zones d’habitation, c’est là qu’ont lieu la majorité des contaminations (Figure 1.2B).

Les transmissions inter-humaines de LASV se produisent le plus souvent dans un contexte familial ou nosocomial. La transmission se fait par contact avec des fluides

A



B

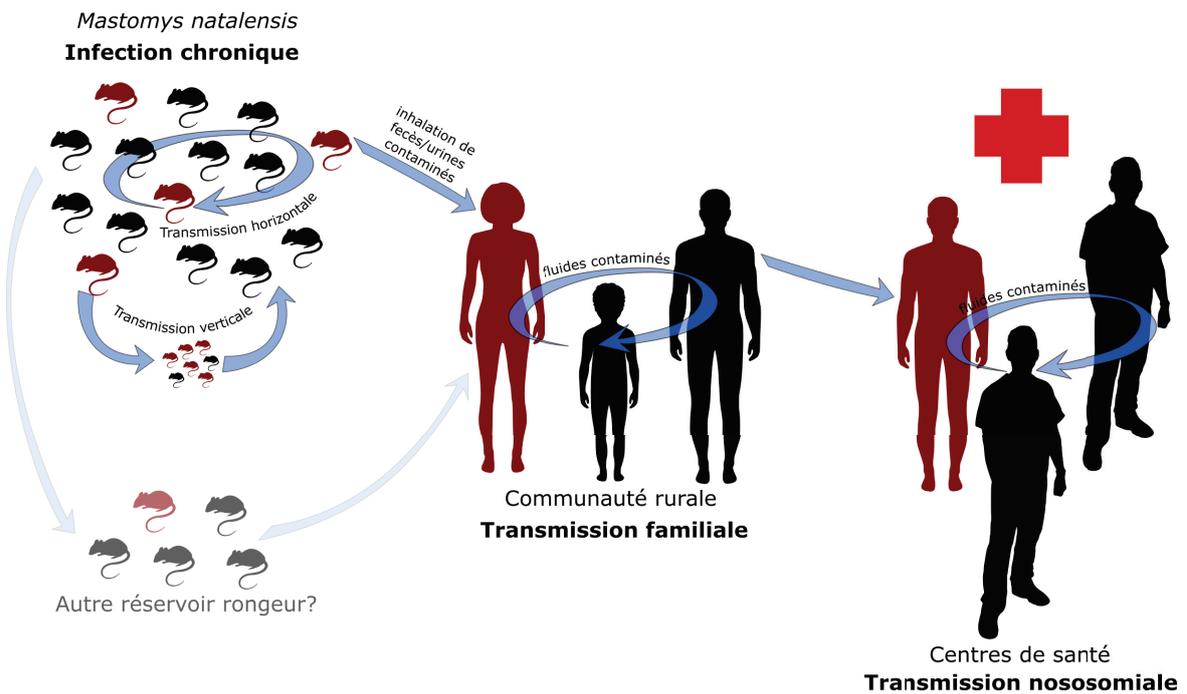


FIGURE 1.2: *Mastomys natalensis*, réservoir de LASV

A) Arbre phylogénétique des populations africaines de *M. natalensis* basé sur la comparaison du cytochrome b. La carte indique la distribution géographique des échantillons utilisés pour la construction de l'arbre. Issu de [68].

B) Modèle de transmission de LASV au sein des populations de *M. natalensis*, du rongeur à l'homme, et au sein des populations humaines.

corporels contaminés et est facilitée par la fréquence des contacts entre le malade et les membres de la famille ou le personnel médical [142]. La reconstitution des motifs de transmission par analyse phylogénétique suggère que peu de cas proviennent d'une transmission inter-humaine. Le taux de transmission inter-humaine peut atteindre 20% dans certaines études, à cause de la présence de "super-spreaders" [2, 112].

**Évolutions possibles** Ces 10 dernières années, l'évolution épidémiologique de LASV est caractéristique d'une émergence. L'incidence de LASF a considérablement augmenté, mais ces variations proviennent plutôt d'une meilleure surveillance que d'une modification de l'écologie de LASV. Même sans modification de la distribution spatiale de LASV, 200 millions de personnes sont à risque (du Sénégal au Nigeria). De plus, LASF fait partie des fièvre hémorragiques virales (FHV) les plus exportées, posant des problèmes de santé publique partout dans le monde [68]. LASF est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un des pathogènes émergents les plus susceptibles de causer des graves épidémies dans un futur proche, et pour lesquels nous disposons de peu de contre-mesures efficaces [215].

## 1.2 Physiopathologie

**Symptômes** La période d'incubation de LASV chez l'homme varie de 7 à 21 jours [63, 133]. Le premier symptôme observé est la fièvre, qui est associée pendant les phases précoces de la maladie à un syndrome pseudo-grippal. Le patient peut souffrir d'une large variété de symptômes peu spécifiques : asthénie, céphalées, douleurs thoraciques et abdominales, toux, pharyngite, nausées, diarrhées (Table 1.1). Plus tardivement, on peut observer chez les patients des signes de perméabilité vasculaire, comme des œdèmes de la face et des effusions pleurales ou péri-cardiaques. Ces signes sont associés à un mauvais pronostic vital. Des œdèmes généralisés, distensions abdominales et saignements sont fréquents chez l'enfant [148]. Dans les cas les plus sévères, on observe une détérioration rapide de l'état de santé du patient entre 6 et 10 jours après l'apparition des symptômes (post-symptômes, p.s) : œdème pulmonaire sévère, détresse respiratoire, encéphalopathie, coma [133, 140]. Des hémorragies modérées au niveau des muqueuses sont fréquemment observées. La mort survient dans un contexte hypotensif, hypovolémique et hypoxique suite à une défaillance multiple des organes. Chez les survivants, le rétablissement débute le plus souvent entre 8 et 10 jours p.s. Près d'un tiers des survivants présentent des séquelles auditives, pouvant aller d'une perte partielle et temporaire d'audition à une surdité permanente [47]. Outre les conséquences individuelles pour les survivants, ces séquelles ont un coût non négligeable pour les pays endémiques, coût estimé à 43 millions de dollars par an pour le Nigeria [130].

**Histopathologie** Le décès des patients infectés par LASV est associé à une défaillance multiviscérale. L'autopsie de patients décédés de LASF a permis d'identifier les organes endommagés par la maladie.

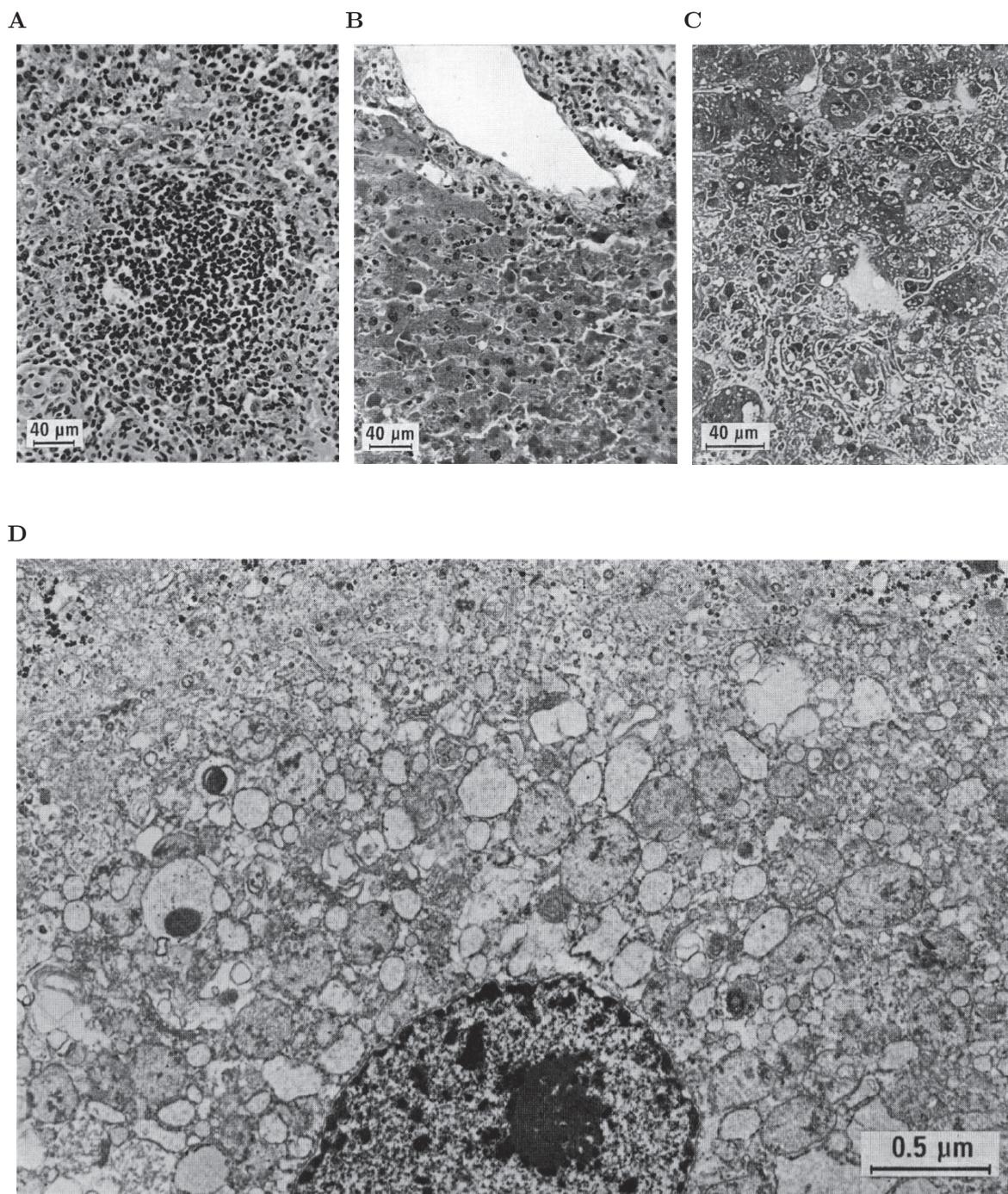
Signes cliniques	Jours		Durée	Incidence		
	Début	Fin		Totale	Survivants	Décédés
Fièvre	1	11	10	100%	100%	100%
Asthénie	3	14	11	56%	54%	60%
Toux	3	14	11	31%	31%	29%
Douleurs thoraciques	4	13	9	24%	25%	21%
Gorge sèche	4	11	7	38%	39%	37%
Problèmes urinaires	4	10	6	66%	62%	85%
Céphalées	4	11	7	55%	58%	46%
Vomissements	4	7	4	63%	65%	56%
Douleurs abdominales	5	8	3	53%	52%	56%
Diarrhée	5	9	4	30%	27%	37%
Conjonctivite	7	12	5	12%	10%	19%
Saignements	7	11	4	25%	22%	35%
Œdème face et cou	9	16	7	12%	8%	22%

**TABLE 1.1: Principales manifestations cliniques de LASF**

L'apparition de la fièvre définit la date de début des symptômes. L'incidence des différents symptômes a été obtenue sur 284 patients du Nigeria (dont 68 décédés) pour lesquels l'infection par LASV a été confirmée par RT-qPCR. Adapté de [225] et [149].

Les lésions les plus courantes sont des nécroses dans le foie, la rate et les glandes surrénales. Certains patients présentent aussi des dommages au niveau du cœur (myocardite avec infiltration à prédominance mononucléaire), des reins (néphrite interstielle, lésions des tubules rénaux), des poumons (œdèmes alvéolaires, pneumonie), de l'intestin (pétéchies, inflammation chronique) et des ganglions lymphatiques (histiocytose). Malgré l'apparition de symptômes neurologiques chez certains patients, aucune lésion n'a été observée dans le système nerveux central [63, 208, 132]. Dans la rate, les lésions sont plutôt situées dans les zones marginales. Elles sont associées à une infiltration de lymphocytes et l'accumulation d'éosinophiles dans la pulpe blanche (Figure 1.3A) [219]. Dans les glandes surrénales, les nécroses touchent majoritairement la zone fasciculée et sont associées à des signes d'inflammation. Mais ces nécroses restent minoritaires, avec plus de 90% de cellules viables [208].

Le foie présente les dommages tissulaires les plus importants. Des foyers nécrotiques associés à la présence d'éosinophiles sont décrits chez la plupart des patients décédés de LASF (Figure 1.3B) [219]. Les cellules nécrotiques peuvent représenter jusqu'à 40% des hépatocytes et les foyers sont distribués aléatoirement. Le cytoplasme des hépatocytes nécrotiques est condensé et vacuolaire (Figure 1.3C). Les hépatocytes nécrotiques sont souvent associés à des virions de LASV, illustrant la réplication de LASV dans le foie (Figure 1.3D). On trouve dans le foie des macrophages (MP) ayant une forte réponse



**FIGURE 1.3: Dommages tissulaires associés à LASF**

Lames histologiques d'organes de patients décédés de LASF. Coloration hématoxyline/éosine (A-B), bleu de toluidine (C) ou acétate d'uranyle/citrate de plomb (D). Issu de [219]. **A)** Accumulation circonférentielle d'éosinophiles amorphes dans la pulpe blanche de la rate. **B)** Foyers nécrotiques dans le foie associés à une éosinophilie et des "Concilman-like bodies". **C)** Hépatocytes des foyers nécrotiques présentant une densité cytoplasmique accrue et une vacuolation. **D)** Hépatocyte présentant un réticulum endoplasmique rugueux dilaté et des densités floconneuses au sein des mitochondries. De nombreux virions de LASV sont aussi visibles le long de la membrane plasmique.

aux dommages cellulaires, mais pas d'infiltration de lymphocytes [132]. Les patients infectés par LASV peuvent être divisés en trois catégories selon l'état de leur foie :

- lésions hépatiques actives (première phase). Moins de 20% des cellules hépatiques sont nécrotiques. Ces nécroses sont dues directement à la réplication virale.
- pic d'hépatite (deuxième phase). 20 à 50% de cellules hépatiques sont nécrotiques. On observe une phagocytose des débris et une régénération cellulaire
- régénération hépatique (dernière phase). Moins de 10% des cellules hépatiques sont nécrotiques, on observe la mitose et la régénération des cellules.

Les dommages hépatiques sont observés chez les patient décédés mais aussi chez les survivants : ils semblent impliqués dans la pathogenèse mais ne sont pas suffisants pour expliquer le décès des patients.

La quantification de certains marqueurs sanguins est un indicateur des dommages tissulaires au cours de LASF. Des augmentations des alanine aminotransférases (ALT), aspartate aminotransférases (AST) et lactate deshydrogénases (LDH) peuvent être observées tout au long de la maladie [187]. Ces trois paramètres sont des indicateurs de la progression de la maladie, mais ne correspondent pas forcément à la gravité des dommages hépatiques [225]. Un dysfonctionnement rénal précède souvent de peu le décès des patients, et peut être détecté grâce à une élévation de la créatine et de l'urée sanguines [149]. Des déséquilibres d'électrolytes sanguins (en particulier le potassium) sont associés chez les patients à un mauvais pronostic vital. Chez certains patients, la présence de lipase dans le sérum est un indicateur de pancréatite [187]. Contrairement à d'autres FHV, LASF n'est pas associée à des troubles de la coagulation. Dans les cas sévères, les patients présentent une thrombocytopenie modérée, mais les facteurs de coagulations ne sont pas impactés [61].

### 1.3 Modèle de la pathogenèse de LASF

Les mécanismes de pathogenèse de LASF et les déterminants de la forte pathogénicité de LASV sont encore mal compris. Cependant, la combinaison d'études *in vitro*, cliniques, histopathologiques et épidémiologiques a permis de dessiner un modèle global de la pathogenèse de LASF (Figure 1.4).

**Phases précoces** Il est largement admis que l'infection par LASV se produit majoritairement au niveau du système respiratoire et du système digestif. LASV peut y infecter les cellules épithéliales, mais surtout les MP et les cellules dendritiques (DC, majoritairement immatures) [115]. L'infection par LASV des MP et des DC est productive, libérant un nombre important de particules virales [9, 11]. Cependant, l'infection n'active pas les cellules et perturbe leur capacité à activer les lymphocytes T (LT) [143, 156]. MP et DC infectés peuvent être impliqués dans la réplication locales, mais aussi entraîner une dissémination du virus et une infection systémique. De nombreux types de cellules, en particulier endothéliales et épithéliales, sont permissives à l'infection par LASV. On peut donc trouver d'importants titres viraux dans la plupart

des organes, dont le foie, les poumons, la rate, les reins et le cœur [208]. La virémie est détectable dès le début des symptômes, et une virémie élevée à l'admission est un mauvais pronostic vital [95]. LASV est excrété par les voies respiratoires et l'urine pendant les 15 premiers jours de la maladie [140]

**Phases tardives** Les phases tardives de l'infection par LASV sont associées à des dommages tissulaires importants, qui sont impliqués dans les symptômes, les dysfonctionnements des organes et le décès du patient. Ces dommages incluent une perméabilisation vasculaire et la présence de foyers nécrotiques dans le foie, mais aussi dans

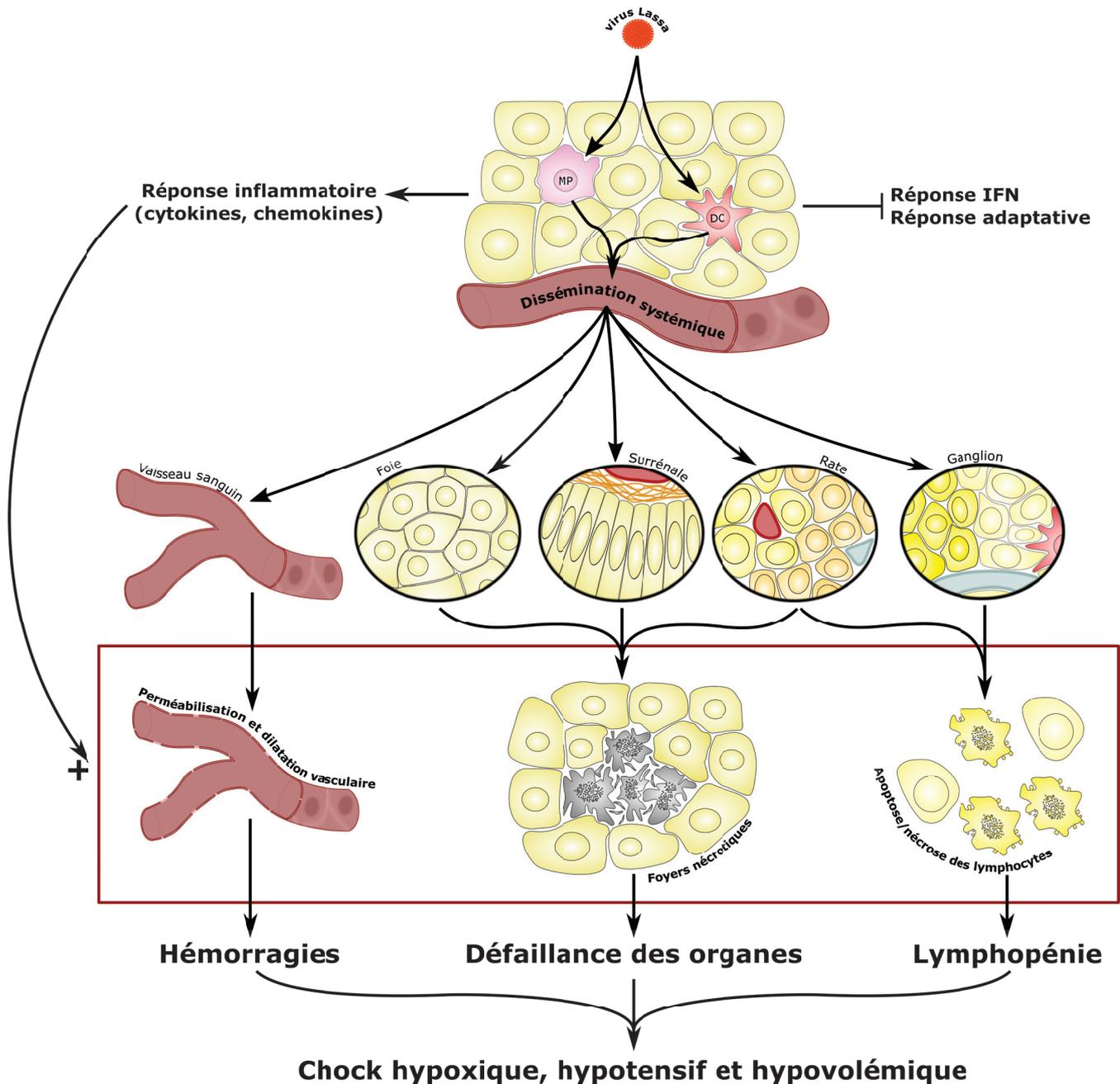


FIGURE 1.4: Modèle de pathogenèse de la fièvre de Lassa

les organes lymphoïdes secondaires. Une lymphopénie, suivie d'une phase de lymphocytose, sont aussi observées.

Les études *in vitro* suggèrent que LASV est très peu cytolitique, la réplication du virus n'est donc pas suffisante pour expliquer les dommages observés. Une implication de la réponse de l'hôte dans ces dommages est fortement suspectée. Chez deux patients européens atteints de LASF et suivis tout au long de la maladie, des niveaux élevés de  $\text{TNF}\alpha$ , d'interféron (IFN)  $\gamma$  et IL-10 ont été détectés [187].  $\text{TNF}\alpha$  et IFN $\gamma$  ont augmenté de manière importante peu avant la mort. Dans d'autres études, ni  $\text{TNF}\alpha$  ni IFN $\gamma$  n'ont été détectés. Le suivi plus fréquent des patients européens peut expliquer cette différence, si l'élévation des cytokines pro-inflammatoires est transitoire. Il est aussi possible que la production de  $\text{TNF}\alpha$  et IFN $\gamma$  ne concerne pas tous les patients. D'autres études ont corrélé les formes sévères de LASF à une immunosuppression, dont la régulation négative d'IL-8 et IP-10 [122].

## 1.4 Diagnostic, traitement et prophylaxie

### 1.4.1 Diagnostic

**Contraintes** Étant donnée la faible spécificité des symptômes de LASF, effectuer un diagnostic différentiel basé uniquement sur la clinique est très difficile. En combinant clinique, biochimie et épidémiologie, un diagnostic est possible, mais il doit être validé en laboratoire.

Le diagnostic n'est pas aisé. Dans l'idéal, il doit remplir les critères suivants :

- rapidité, car la prise en charge précoce de LASF améliore la survie des patients
- spécificité
- sensibilité, rendue difficile par la grande variabilité entre les souches de LASV
- pertinence, selon la phase de la maladie à laquelle le diagnostic est réalisé
- biosécurité pour les personnels de laboratoire, par l'utilisation d'équipements P4 ou l'inactivation des échantillons
- facilité technique, afin d'être adaptable aux structures de santé des pays d'endémicité

**Isolement** La technique la plus sensible est l'isolement du virus par culture cellulaire. L'isolement peut être réalisé à partir d'échantillon sanguin, de liquide céphalo-rachidien, et plus rarement d'un prélèvement d'urine ou d'un écouvillon pharyngé [168]. Le prélèvement est mis en culture sur des cellules VeroE6. Dans certains cas, LASV peut aussi être isolé chez des animaux de laboratoire, par exemple par injection intracérébrale chez la souris [148]. Une deuxième technique est ensuite nécessaire pour vérifier la nature du virus isolé. Les avantages de cette technique sont sa sensibilité et son large spectre. Elle est en revanche peu spécifique, longue (plusieurs jours de culture sont nécessaires avant d'obtenir un résultat) et dépendante de l'accès à un laboratoire de haute sécurité. L'isolement est donc adapté à l'étude épidémiologique et génétique

de LASV, mais moins au diagnostic de routine.

**Anticorps et antigènes** Le deuxième type de techniques de diagnostic est la détection d'antigènes (Ag) ou d'anticorps (Ac). Historiquement, les Ac anti-LASV étaient détectés par immunofluorescence (IFA, Immunofluorescence assay) : des lames de cellules infectées par LASV étaient révélées en utilisant les prélèvements de patients comme Ac primaires. Cette technique a peu à peu disparu au profit de l'ELISA, qui est plus simple, plus sensible, plus spécifique et moins variable d'un observateur à un autre. La détection d'Ac anti-LASV a l'avantage d'avoir un spectre large, mais est dépendante de la phase de la maladie. En effet, les Ac ne sont pas détectable avant la deuxième semaine p.s, et chez certains patients n'apparaissent jamais. Des techniques de capture d'Ag permettent un diagnostic plus précoce. Basée sur le même principe que l'ELISA, la capture d'Ag est révélée avec des Ac polyclonaux anti-LASV, ou plus récemment des Ac monoclonaux ciblant la nucléoprotéine (NP, qui est assez bien conservée parmi les souches de LASV) [168]. Comme la sérologie, la capture d'Ag est dépendante de la phase de la maladie : les Ag de LASV ne sont détectables que pendant la première semaine p.s. La combinaison de capture d'antigène et de sérologie IgG et IgM peut permettre de résoudre les problèmes de chronologie : une étude clinique a montré que, à partir du début des symptômes, les patients étaient positifs en Ag la première semaine uniquement, positifs en IgM la deuxième semaine et positifs en IgG à partir de la troisième semaine [17]. Cette combinaison peut être particulièrement utile sur le terrain, car ce sont des techniques simples, peu chères et qui peuvent être réalisées sur des échantillons inactivés.

Technique	Spécificité	Sensibilité	Plasticité	Période de validité	Rapidité faisabilité	Coût	Risques
<b>Isolement</b>	-	+++	++	Virémie	--	-	+++
<b>IFA</b>	+	+	+	Phases tardives	+/-	+/-	++
<b>ELISA</b>	++	++	+	Phases tardives	+	+/-	+/- (inactivé ou non)
<b>Détection d'Ag</b>	++	++	+	Virémie	+	+/-	+/- (inactivé ou non)
<b>RT-qPCR (SybrGreen)</b>	++	+++	-	Virémie	+	+	-
<b>RT-qPCR (sonde)</b>	++	+++	--	Virémie	+	++	-
<b>Séquençage</b>	+++	++	++	Virémie	-	+++	-

**TABLE 1.2: Avantages et inconvénients des techniques de diagnostic de LASV**

**Acides nucléiques** La dernière catégorie de techniques de diagnostic est la détection d'acides nucléiques. Dans le cas de LASV, il existe de nombreuses RT-qPCR en temps réel. Ces techniques sont sensibles et spécifiques, et sont devenues les méthodes de diagnostic les plus courantes [168]. Leur désavantage majeur tient à leur spécificité : les souches de LASV étant très variables, la divergence génétique peut rapidement produire des souches pas ou peu détectées. C'est une des raisons pour lesquelles les qPCR ciblant LASV utilisent préférentiellement des intercalant d'ADN plutôt que des sondes fluorescentes (normalement favorisées car le bruit de fond est plus faible) : l'utilisation d'une sonde ajoute la pression d'une séquence supplémentaire et donc le risque de mutants d'échappement. L'amélioration des techniques de séquençage et la simplification des appareils pourraient rendre cette technique adaptable au diagnostic. Le séquençage *de novo* a l'avantage d'être aussi spécifique que les PCR, sans le risque de faux-négatifs dus à la variation génétique des souches. Pour l'instant, le séquençage reste trop compliqué et trop cher pour se démocratiser dans le cadre du diagnostic LASV.

#### 1.4.2 Prophylaxie

**Prévention** La méthode prophylactique la plus simple pour lutter contre LASV est de prévenir la transmission. Le contrôle des populations de *M. natalensis* serait une solution, mais étant donnée la distribution très large de ces rongeurs, c'est difficilement applicable sur le terrain [141]. Des mesures simples peuvent cependant limiter la transmission rongeur/humain, par exemple en mettant la nourriture hors de portée des rongeurs et en évitant le contact avec ces rongeurs. La transmission inter-humaine peut être évitée en adoptant des mesures d'hygiène, en utilisant des équipements de protection individuels et collectifs et en mettant en place un suivi des cas contacts. La mise en place de ces mesure nécessite l'identification des cas de LASV, dont le diagnostic n'est pas systématique.

**Vaccins** La prévention de la transmission pourrait réduire les cas de LASV, mais pas stopper complètement la circulation de LASV. Pour cela, il faudrait un vaccin efficace contre ce virus. Il n'y actuellement aucun vaccin disponible chez l'homme, mais un certain nombre d'équipes de recherche s'intéressent à cette question.

Ces études ont tout d'abord montré qu'un vaccin efficace contre LASV ne pouvait pas être inactivé. En effet, un vaccin basé sur un virus irradié induit chez le singe la production d'anticorps anti-LASV, mais n'est pas protecteur [114]. Il semble que ce manque d'efficacité soit lié à la mauvaise présentation des antigènes, qui ne permet pas le développement d'une réponse T efficace. L'épitope majoritaire dans la conception de vaccins contre LASV est la glycoprotéine (GP), mais certaines études suggèrent que l'ajout de la NP améliore l'immunogénicité [62]. Parmi les vaccins qui ont été envisagés, on compte des virus sauvages (MOPV) ou réassortants (ML29, chimère de MOPV et LASV), des virus recombinants (plateforme vaccine, virus de la stomatite

vésiculeuse VSV, fièvre jaune 17D (Yellow Fever Virus, YFV), alphavirus comportant des antigènes de LASV [25]), et des vaccins ADN délivrés par électroporation [37].

Nombre de ces vaccins ont donné des résultats préliminaires intéressants chez l'animal, mais certains ne sont pas adaptés à une utilisation chez l'homme. Manque de sûreté biologique (virus non atténués), approche "prime-boost" (difficile à mettre en œuvre dans les pays endémiques), complexité d'administration et coût important sont autant d'obstacles à la mise sur le marché et l'utilisation globale de ces prototypes vaccinaux. Deux candidats développés dans notre laboratoire semblent prometteurs. Le premier, MOPEVAC, est une plateforme MOPV atténué (muté dans la NP) portant la GP de LASV, et est protecteur à 100% chez le primate non humain (PNH) [35]. Le second, MeV-LASV, est un vaccin bivalent rougeole/LASV, constitué d'une souche vaccinale de rougeole portant la GP et une NP mutée de LASV. Chez le singe, il induit en une seule injection une immunité stérilisante contre LASV, et une réponse contre la rougeole. Suite à un financement proposé par un consortium de gouvernements et d'ONG (CEPI), un essai clinique doit commencer en 2019.

### 1.4.3 Traitements

**Traitements disponibles** Comme pour d'autres FHV, la survie des patients infectés par LASV est améliorée par un traitement symptomatique. Transfusion sanguine, hydratation, administration de paracétamol, phylometadione, ringer lactate, antipaludéens et antibiotiques à large spectre permettent de contrebalancer les symptômes, de prolonger la survie des patient et d'attendre l'éventuel développement d'une réponse immunitaire efficace. Actuellement, ces traitements de soutien sont associés à la ribavirine (1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), un analogue nucléosidique. Chez les patients "à haut risque" (avec une virémie élevée), un traitement intraveineux avec de la ribavirine débuté avant le 6e jour p.s permet de diminuer le taux de mortalité de 67 à 9% [132]. Chez les patients dont le traitement a été commencé plus tardivement, le taux de mortalité était de 47%. La ribavirine, qui est pour l'instant la seule molécule disponible contre LASV, a plusieurs inconvénients : son coût, son administration par intraveineuse, sa toxicité (anémie et problèmes rénaux), et la diminution de son efficacité lorsque le traitement est commencé plus tardivement. Pour une lutte efficace contre LASV, il est nécessaire de développer de nouveaux traitements.

**Sérothérapie** La sérothérapie a été testée contre LASV. Le transfert de plasma de convalescent ne permettait pas de réduire la mortalité chez les patients infectés par LASV [132]. Des études plus récentes ont testé des anticorps recombinants monoclonaux ciblant la GP de LASV, *in vitro* et chez le cobaye [46]. Parmi les 125 anticorps testés, 11 étaient efficaces *in vitro* et 5 ont protégé les cobayes infectés. Cependant, pour être efficaces, ces anticorps ont été administrés peu de temps après l'infection. À cette contrainte temporelle s'ajoutent des contraintes de production de ces anticorps, le potentiel de cette approche thérapeutique est donc limité.

**Antiviraux en développement** La piste thérapeutique la plus étudiée en ce moment est le favipiravir. Développé contre la grippe, il a été testé contre le virus Ebola pendant l'épidémie de 2014-2015. Son efficacité contre LASV est étudiée par plusieurs équipes. Dans un modèle d'infection de cobayes par une souche de LASV adaptée (GPA-LASV, létal à 100%), l'administration quotidienne de favipiravir à partir de 2, 5, 7 ou 9 jours post-infection (p.i) diminuait la mortalité de plus de 80% (selon la dose et la date de début du traitement) [182]. Un traitement équivalent avec de la ribavirine prolongeait la survie des cobayes mais ne diminuait pas la mortalité. Les animaux traités avec du favipiravir avaient aussi moins de symptômes et une charge virale plus faible (dans le sang ou les organes). Une autre étude a testé l'efficacité du favipiravir dans un modèle de souris chimériques (voir section 3.1.2) [146]. Dans ce modèle, seule une forte dose de favipiravir permettait de diminuer la mortalité des animaux suite à l'infection par LASV. La combinaison de favipiravir et de ribavirine permettait d'obtenir le même résultat, avec des doses plus faibles de favipiravir. Si ces études *in vivo* semblent prometteuses, la combinaison favipiravir/ribavirine n'a été utilisée que chez deux patients européens. Les tests de sûreté ont déjà été réalisés pour sa mise sur le marché contre la grippe, mais son efficacité contre LASV chez l'homme doit encore être démontrée.

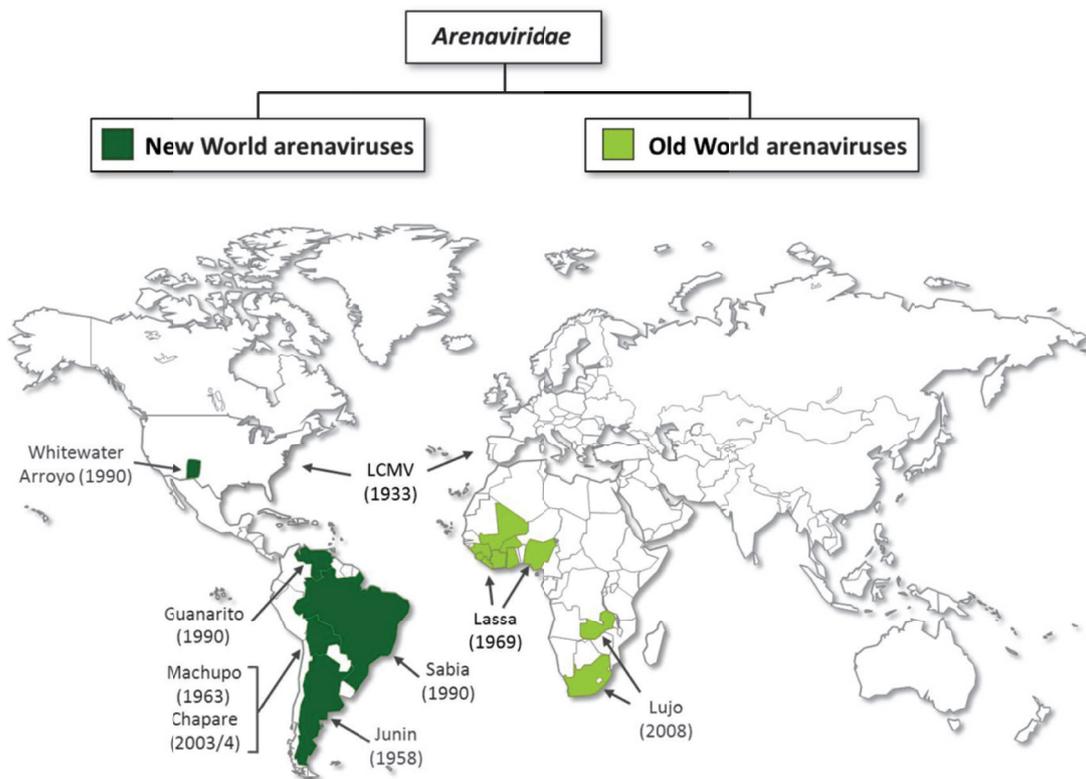
La recherche d'autres molécules thérapeutiques efficace contre LASV continue. Certaines équipes développent des techniques *in vitro* qui permettent un screening simple d'inhibiteurs potentiels, par exemple en utilisant des essais minigénome [212]. D'autres équipes se focalisent sur le design de molécules à large spectre, efficaces non seulement contre LASV mais aussi contre d'autres virus. Des outils *in silico* permettent d'élaborer et de tester ce type de molécules sur un nombre important de pathogènes [185]. Ces méthodes de tests à haut débit doivent être complétées par un design spécifique, basé sur notre compréhension des mécanismes de l'infection par LASV. Une analyse de l'interactome de la NP de LCMV a permis d'identifier des protéines cellulaires comme cibles thérapeutiques, et il existe déjà des molécules approuvées qui agissent sur ces protéines [89]. Mais une approche ciblée nécessite tout d'abord une amélioration de notre compréhension globale de LASV et de LASF.

## 2 Biologie cellulaire et moléculaire des Arénavirus

### 2.1 Phylogénie

**Arénavirus** Les *Arenaviridae* constituent une famille de virus à génome ARN négatif. Cette famille contient trois genres : *Mammarenavirus*, *Reptarenavirus* et *Hartmanivirus* [171, 87]. Les Reptarénavirus (et hartmanivirus, récemment décrits) sont des virus de serpents responsables de maladies infectieuses (inclusion body disease), en particulier en captivité. Les Mammarénavirus sont des robovirus, qui ont un réservoir murin mais peuvent infecter d'autres espèces de mammifères.

Le genre *Mammarenavirus* est divisé en deux sérogroupes. Les Arénavirus de l'ancien monde (complexe LCMV-LASV) circulent majoritairement en Afrique (Figure 1.5) et ont pour réservoir des rongeurs de la sous-famille *Murinae* (Rodentia : Sciurognathi : Muridae : Murinae). Le premier Arénavirus d'Asie, le virus Wenzhou, a été isolé en 2015 dans la province de Zhejiang [110]. Les Arénavirus du nouveau monde (ou complexe TACV) sont des virus d'Amérique dont les réservoirs appartiennent à la

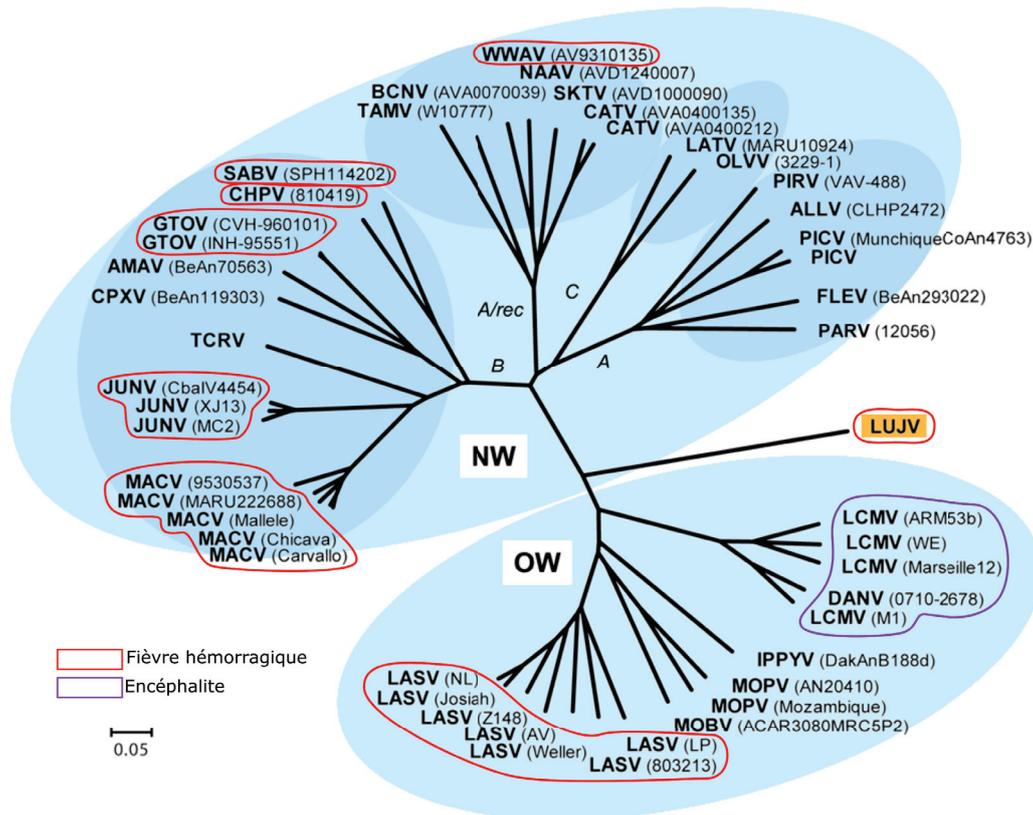


**FIGURE 1.5:** Distribution géographique des Arénavirus pathogènes pour l'homme

Localisation des Arénavirus pathogènes pour l'homme selon leur clade (ancien monde ou nouveau monde). Les dates entre parenthèses indiquent l'année de leur découverte. Issu de [58].

sous-famille *Sigmodontinae*. Il y a deux exceptions : TACV, isolé chez la chauve-souris *Artibeus spp.*, et le virus Sabia (SABV) dont le réservoir est encore inconnu [21]. La comparaison des séquences nucléotidiques des Mammarénavirus (séquence codante NP, séquence codante GP ou segment S) conserve cette répartition ancien monde/nouveau monde. Les Arénavirus du nouveau monde sont divisés en 4 clades : A, A/rec, B et C (figure 1.6).

Parmi les Arénavirus de l'ancien monde et du nouveau monde, on trouve des virus pathogènes pour l'homme et d'autres non pathogènes. Le virus LCMV est asymptomatique chez la plupart des adultes, mais peut provoquer des encéphalites. Chez le fœtus, il peut entraîner des séquelles graves (perte de la vue, retard psychomoteur, microcéphalie, encéphalomalacie, hydrocéphalie, chorioretinite) voire la mort intra-utérine [15]. Les autres Arénavirus pathogènes sont responsables de FHV chez l'homme. Il s'agit de LASV, Lujo (LUJV), Machupo (MACV), Junin (JUNV), Guanarito (GTOV), Chapare (CHPV), SABV et White Water Arroyo (WWAV) (Figure 1.6).



**FIGURE 1.6: Classification phylogénétique des *Mammarenaviridae***

Alignements réalisés à partir des séquences nucléotidiques des segments S du génome des différentes espèces. La construction de l'arbre a été réalisée par jonction de proche en proche en utilisant un modèle Jukes-Cantor. L'échelle indique le nombre de substitutions par site. Les références GenBank des séquences utilisées sont disponibles dans la publication d'origine. Adapté d'après [24].

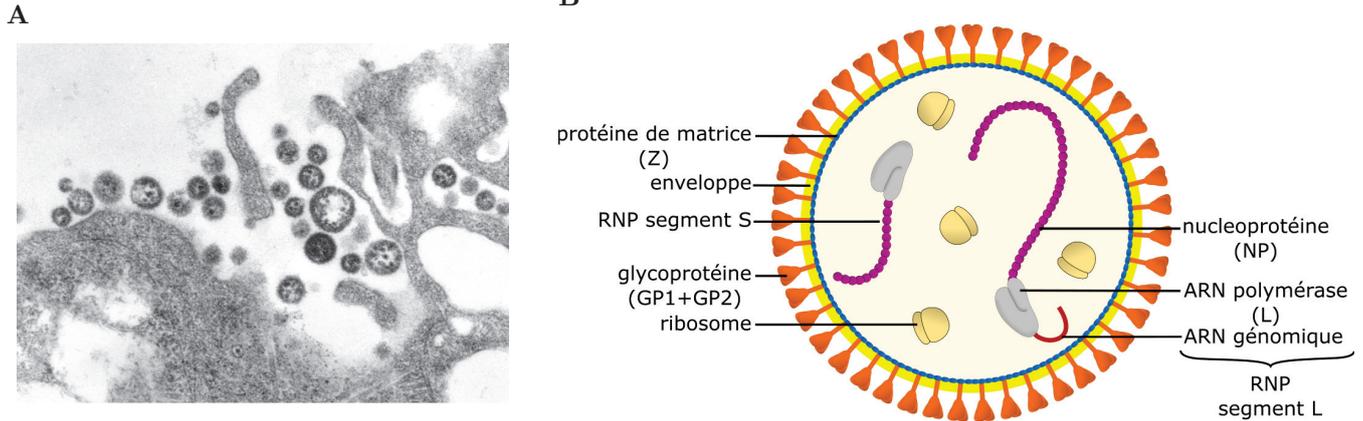
**LASV** La variabilité phylogénétique de LASV est importante : même au sein du gène de la NP, qui est considéré comme une séquence conservée, les souches de LASV ont jusqu'à 27% de divergence (14.8% dans la séquence protéique) [2]. Si LASV est considéré comme une espèce, il a été proposé récemment de le définir plutôt comme un complexe d'espèces [68]. L'ancêtre commun le plus récent de LASV semble être apparu il y a environ 1 000 ans au Nigeria. Les souches de LASV circulant actuellement au Nigeria appartiennent à 3 lignages distincts (I à III) [2]. Une souche nigérienne isolée chez *H. pamfi* en 2016 se regroupe avec les lignages I, II et III [150]. Les souches circulant au Sierra Leone, en Guinée et au Liberia (pays de la "Mano River Union", MRU) constituent le lignage IV et ont divergé (géographiquement et phylogénétiquement) des autres souches il y a environ 150 ans. Des échantillons isolés au Mali et en Côte d'Ivoire ont permis d'isoler un  $V^{eme}$  lignage [125]. Des analyses supplémentaires des séquences de ces échantillons suggèrent que ce lignage V est en fait un sous-lignage du IV [214]. Deux patients, infectés par LASV au Togo en 2016, ont été traités en Allemagne et aux Etats-Unis. La souche de LASV isolée chez ces deux patients semble correspondre à un  $VI^{eme}$  lignage, proche des lignages I et II. Ce lignage VI doit encore être validé par le Comité International de Taxonomie des Virus [214].

## 2.2 Structure et cycle viral

### 2.2.1 Virions

**Morphologie** Les premières études de LASV en microscopie électronique ont montré des virions pléiomorphiques, plutôt sphériques, d'une taille de 70 à 150  $\mu\text{m}$  et ayant un aspect granuleux (Figure 1.7A) [27, 144]. Cet aspect "sablé" provient de l'intégration de ribosomes à la particule virale et est à l'origine du nom *Arenaviridae* (*arenosus* signifiant "sableux" en latin). La morphologie caractéristique des Arénavirus a été longtemps utilisée en diagnostic : après la mise en culture des prélèvements à identifier, des images du virus obtenues par microscopie électronique permettaient de préciser le diagnostic [168].

**Structure** La structure des particules virales des Arénavirus est décrite en Figure 1.7B. Les virions possèdent une enveloppe lipidique issue de la membrane plasmique des cellules infectées. La couche intérieure de la membrane interagit avec une couche protéique composée de multimères de Z (protéine de matrice). La GP, composée de deux sous-unités GP1 et GP2, est majoritairement exposée à l'extérieur du virion. Elle possède un domaine transmembranaire et interagit à l'intérieur de la particule avec des protéines Z. Dans la particule virale se trouvent deux ribonucléoprotéines (RNP) correspondant aux deux segments du génome viral (S=small, L=large). Une RNP est constituée d'un segment d'ARN génomique à polarité négative, de NP et d'ARN polymérase ARN-dépendantes (L). Les ARN sont complètement masqués par leurs interactions avec les NP. Il a été montré pour le virus LCMV que la NP et la Z interagissaient, permettant



**FIGURE 1.7: Structure de la particule virale des *Arenaviridae***

A) Image en microscopie à transmission électronique (MET). Les formes rondes correspondent à des virions de LASV, les autres à des débris cellulaires. (Public Health Image Library, CDC).

B) Représentation schématique de la structure d'une particule virale de LASV. Cette structure est commune à tous les Arénavirus connus.

l'ancrage des RNP dans la particule virale [153]. Les virions peuvent aussi contenir des protéines cellulaires, dont des protéines Ras, des protéines du complexe ESCORT et des ribosomes [229]. La quantité de ribosomes présents dans les particules virales suggère que leur incorporation n'est pas aléatoire, et il semblerait que certaines protéines ribosomales interagissent avec la protéine Z de LCMV [20]. Cependant, les ribosomes ne semblent pas nécessaires à la réplication virale [109].

## 2.2.2 Génome et stratégie de réplication

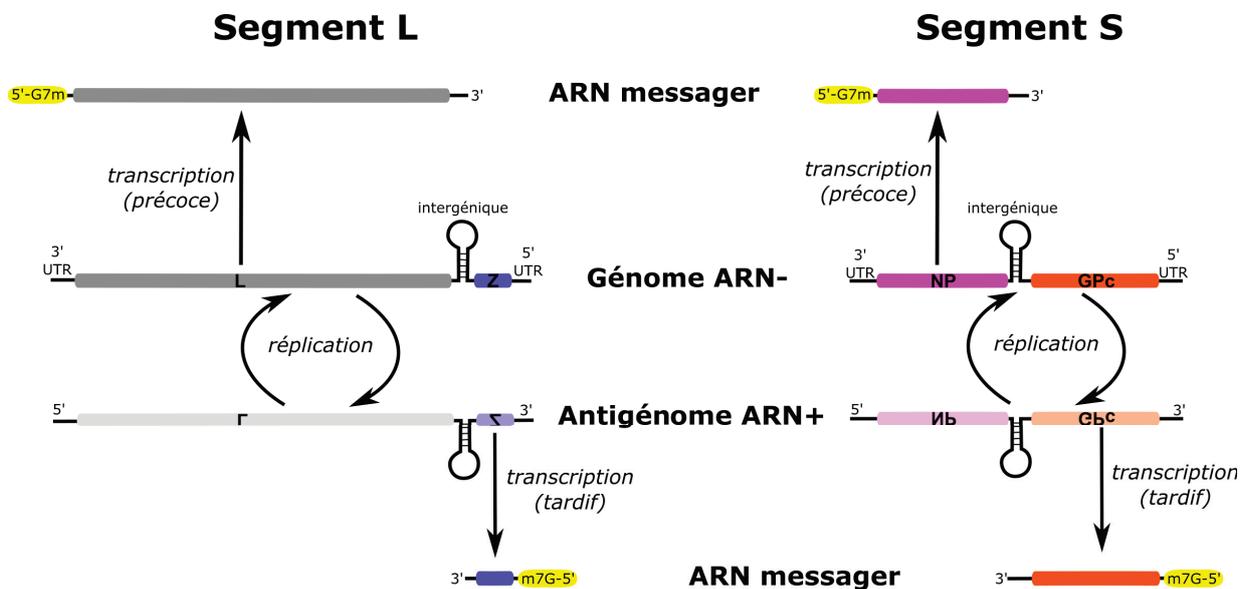
**Historique** Dès 1970, des cultures de LASV en présence de 5-bromodeoxyuridine, qui n'affecte pas la réplication virale, suggèrent que le génome de LASV est constitué d'ARN [27]. En 1984, il est montré par centrifugation sur gradient que ce génome ARN est composé de deux segments, un ayant un poids moléculaire de  $2,2 \cdot 10^6$  dénommé "large" (L), et un second d'un poids moléculaire de  $1,3 \cdot 10^6$  dénommé "small" (S) [118]. Ce génome ARN négatif bisegmenté est commun à tous les Arénavirus. Les premières séquences du génome de LASV sont obtenues en 1986, avec le séquençage de la GP et de la région intergénique (IGR) du segment S [6]. La séquence complète n'a été connue qu'en 1997, avec l'obtention de la région 5' du segment L [49]. Le segment S fait environ 3,5 kb, et le segment L 7,2 kb. Les techniques actuelles de séquençage ont montré la grande variabilité entre les souches de LASV.

**Organisation du génome** Chaque segment d'ARN viral contient deux ORF (Open Reading Frame, cadre de lecture), comme illustré dans la figure 1.8. Le segment S code pour la NP (codée en sens) et GPc, le précurseur des glycoprotéines GP1 et GP2 (codé

en antisens). Le segment L code pour l'ARN-polymérase (ARNpol) L (codée en sens) et la protéine de matrice Z (codée en antisens).

Les régions 5' et 3' UTR contiennent les promoteurs des gènes viraux [77]. Les séquences de 19 nucléotides situées à chaque extrémité sont très conservées parmi les Arénavirus et quasiment complémentaires les unes des autres. Cette complémentarité permet la formation d'une structure "pan-handle", importante dans l'initiation du complexe de réplication [191]. Les résidus 1 à 12 sont très conservés, et cette séquence est nécessaire à l'interaction avec le complexe de réplication. Les résidus 13 à 19 sont plus variables, et leur fonction dans le promoteur dépend uniquement de l'interaction entre les résidus en 5' et en 3'.

Les IGR des deux segments sont hautement structurées chez tous les Arénavirus. Ces régions non codantes, situées entre les deux codons stop des gènes, forment des structures tige-boucle et semblent jouer un rôle dans la terminaison de la transcription [6]. Il a été montré que l'IGR du segment S est hautement plastique, alors que celui du segment L l'est moins. Chez LCMV, le remplacement de l'IGR du segment S (par celui de LASV ou un IGR de synthèse) ne perturbe pas la réplication virale, alors que la modification de l'IGR du segment L induit une atténuation [88]. Chez LASV, l'IGR du segment S contient une unique structure tige-boucle, cependant chez l'Arénavirus proche MOPV, cet IGR en contient deux [218].



**FIGURE 1.8: Réplication du génome des *Arenaviridae***

Le codage antisens des protéines des Arénavirus implique une stratégie de transcription/réplication en deux temps. Pendant la phase précoce, seuls les gènes L et NP, codés par le génome ARN<sup>-</sup>, sont transcrits. L'augmentation de la quantité de L et de NP permet la réplication du génome, avec un intermédiaire ARN<sup>+</sup>, et la formation de RNP. Pendant la phase tardive, l'antigénome ARN<sup>+</sup> est transcrit, permettant la synthèse des protéines Z et GPc. La présence de ces protéines initie la formation des virions et leur bourgeonnement.

**Stratégie de réplication** Le développement d'un système de réplicon LASV a permis de montrer que la NP et la L étaient nécessaires et suffisantes pour la réplication virale, ce qui se vérifie pour d'autres Arénavirus [76]. Le complexe de réplication, contenant une ou plusieurs copies des protéines L et NP, interagit avec les segments génomiques au niveau des 3'-UTR [198]. Dans les phases précoces de l'infection, le complexe de réplication peut synthétiser à partir du génome un ARN positif complet, appelé antigénome, ou des ARN messagers (ARNm) codants pour la NP ou la L (Figure 1.8). Les promoteurs en 3' UTR ne semblent pas réguler activement le ratio de synthèse antigénome/ARNm [77]. Lors des phases tardives de la réplication des Arénavirus, les antigénomes servent de matrice à la synthèse de génomes ARN négatif et d'ARNm codant pour les protéines GPc et Z (Figure 1.8).

La transcription est basée sur un système de vol de coiffe. La NP des Arénavirus possède une cavité dans son domaine N-terminal qui interagit avec la coiffe m<sup>7</sup>GpppN des ARNm cellulaires [167]. Chez d'autres virus, l'ARNm cellulaire ainsi fixé est clivé par un domaine endonucléase (EdN) de l'ARNpol. La L de LASV possède un domaine EdN, qui est nécessaire à la réplication virale mais qui semble moins efficace que chez d'autres virus [173]. La polymérisation des ARNm est ensuite stoppée par les structures secondaires des IGR.

La réplication semble basée sur une stratégie dite "prime-and-realign" (initier et réaligner). Selon ce mécanisme, décrit chez les Bunyavirus et le virus Influenza, l'ARN-pol ne débute pas à l'extrémité 3' de l'antigénome (position +1). La synthèse d'ARN commence par un GTP à la position +2, et le pppGpCOH est ensuite réaligné sur la matrice. Le génome néosynthétisé possède donc une base G supplémentaire en 5'. Ce G reste non appariée lors de l'interaction 3'/5' qui forme la "pan-handle" [115].

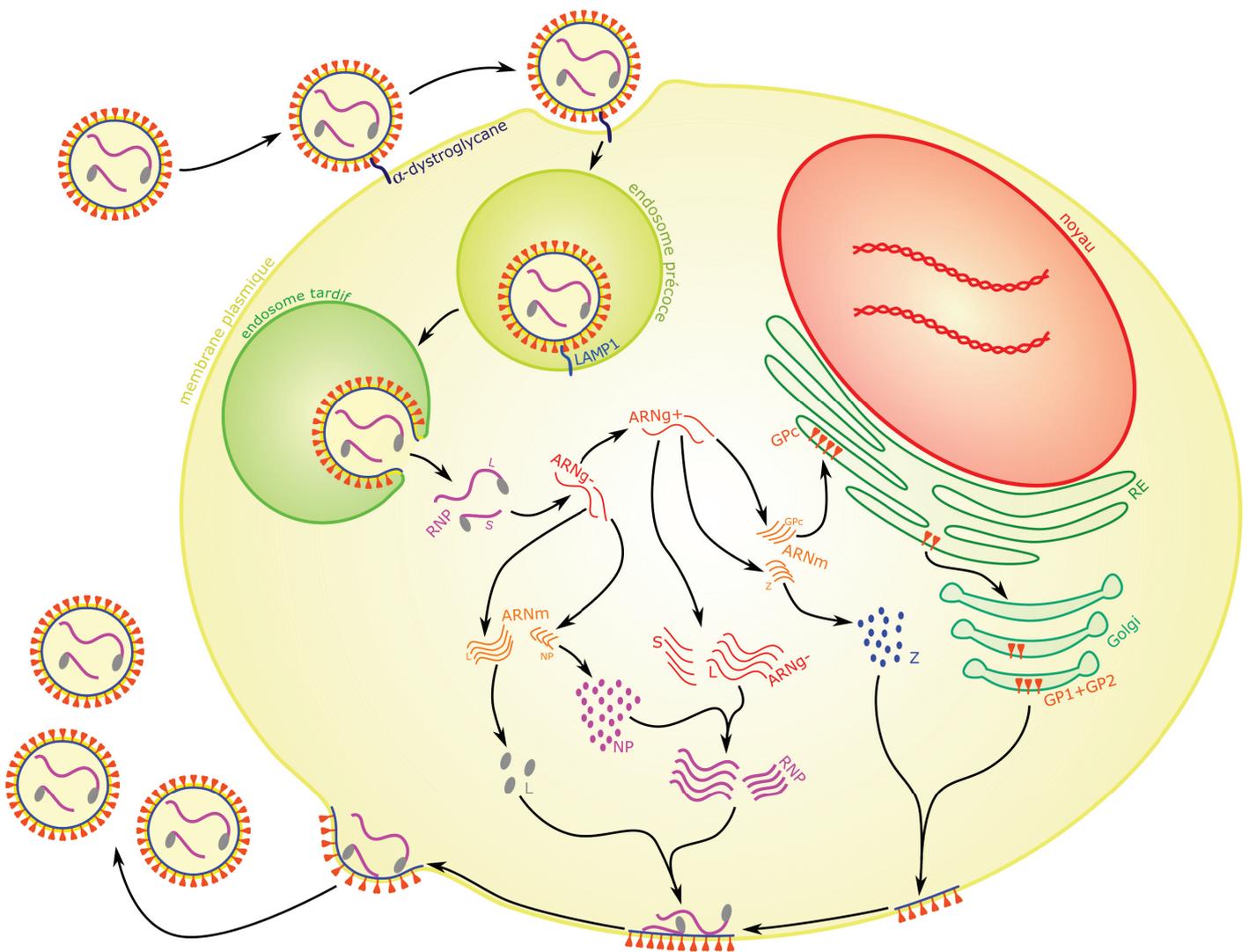
### 2.2.3 Cycle viral

Le cycle viral est assez conservé parmi les Arénavirus. Il existe cependant des différences entre Arénavirus de l'ancien monde et du nouveau monde, ainsi qu'au sein de ces deux clades, en particulier au niveau de l'entrée virale.

**Entrée : nouveau monde** Le récepteur d'attachement des Arénavirus du nouveau monde est le récepteur à la transferrine Tfr1 [170]. Tfr1 est exprimé par de nombreux types cellulaires, expliquant le tropisme large de ces virus. Alors que les Arénavirus du nouveau monde pathogènes pour l'homme interagissent avec Tfr1 humain, les non pathogènes interagissent avec des orthologues de cette protéine. Ces différences suggèrent un rôle de ce récepteur dans la pathogénicité des virus [135]. Il a été montré pour JUNV que l'internalisation des particules virales était clathrine-dépendante, ce qui correspond au trafic normal de Tfr1 [128]. Cependant, comme la fusion de JUNV avec la membrane plasmique nécessite un pH très acide (5,5), il semble que le virus détourne Tfr1 de son chemin traditionnel de recyclage par les endosomes précoces. L'attachement à Tfr1 (ou des analogues), l'endocytose clathrine-dépendante et la

fusion dans des endosomes tardifs est commune à tous les Arénavirus du nouveau monde connus.

**Entrée : ancien monde** Pour les Arénavirus de l'ancien monde, le récepteur d'attachement est l' $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ DG) [31]. Cette molécule interagit avec les laminines à la surface des cellules et permet l'attachement à la matrice extracellulaire (MEC). C'est une protéine ubiquitaire, mais qui est fortement exprimée sur les MP et les DC. L'interaction de LASV avec l' $\alpha$ DG perturbe la membrane plasmique, par la compétition entre LASV et les laminines. Elle perturbe aussi les signaux intracellulaires du



**FIGURE 1.9: Cycle viral de LASV**

LASV entre dans la cellule par un mécanisme d'internalisation encore inconnu en utilisant un récepteur d'attachement, l' $\alpha$ -DG, et un récepteur de fusion, LAMP1. Les RNP sont libérées dans le cytoplasme où a lieu la transcription, la traduction et la réplication. L'assemblage et le bourgeonnement se font à la membrane plasmique. Le cycle des autres Arénavirus est proche de celui de LASV.

$\beta$ -dystroglycan, qui est la part transmembranaire du récepteur [177]. Des modifications post-traductionnelles de l' $\alpha$ DG sont nécessaires à son interaction avec LASV. Parmi les gènes impliqués dans ces modifications, certains allèles sont positivement sélectionnés dans les populations du Nigeria et semblent conférer une protection contre LASV [3]. D'autres récepteurs d'attachement peuvent être utilisés par les Arénavirus de l'ancien monde, bien qu'ils soient moins efficace que l' $\alpha$ DG : Axl, Tyro3, LSECtin et DC-SIGN [192, 57]. Ces récepteurs pourraient être essentiels pour l'infection de cellules exprimant peu d' $\alpha$ DG, comme les hépatocytes. L'internalisation des particules virales des Arénavirus de l'ancien monde est dépendante du cholestérol mais indépendante de la clathrine et de la cavéoline [135]. Des étude suggèrent que l'internalisation des LASV utilise une voie inhabituelle de macropinocytose, qui entraîne très peu de perturbations de la cellule hôte [152].

Suite à leur internalisation, les particules virales des Arénavirus de l'ancien monde sont adressées vers les endosomes tardifs via un processus dépendant des microtubules et du complexe ESCORT [158]. L'acidification des endosomes permet la fusion de la membrane du virion avec la membrane de l'endosome et le relargage des RNP dans le cytoplasme [85]. Pour LASV, l'acidification des endosomes induit un changement de conformation des GP et un changement d'interacteur de l' $\alpha$ DG vers LAMP1 [92]. Les premières études sur le sujet suggéraient que l'interaction GP-LAMP1 était nécessaire à la fusion du virion avec la membrane endosomale, l' $\alpha$ DG et LAMP1 étant considérés respectivement comme un récepteur d'attachement et un récepteur d'entrée. Des étude plus récentes ont montré que l'entrée est aussi possible en absence de LAMP1, mais l'utilisation de LAMP1 permet une entrée plus efficace à un pH moins acide [85]. L'entrée via deux récepteurs semble être plus avantageuse pour le virus et pourrait concerner les autres Arénavirus de l'ancien monde, même si rien n'a encore été démontré. L'entrée de LUJV est un cas particulier au sein des Arénavirus. Malgré sa classification parmi les Arénavirus de l'ancien monde, il est phylogénétiquement assez divergent. La GP de LUJV interagit avec NRP2, et CD63 joue un rôle de cofacteur pour la fusion membranaire pH-dépendante [169].

**Transcription, traduction et réplication** La fusion des particules virales libère les RNP dans le cytoplasme. Les mécanismes de réplication et transcription sont explicités en section 2.2.2. Les ARN génomiques et antigénomiques sont presque exclusivement sous forme de RNP, et ont une structure circulaire due à la complémentarité des extrémités 3' et 5'. La NP a longtemps été considérée comme un régulateur du switch réplication/transcription, mais les données expérimentales semblent indiquer le contraire [162]. La protéine Z semble impliquée dans la régulation des phases du cycle viral [102].

La traduction des protéines virales par la machinerie cellulaire n'a pas de caractéristique originale. La protéine Z est, après traduction, myristoylée en N-ter (glycine en position 2) [161]. La GP est traduite sous forme d'un polypeptide pré-GPc qui est adressé vers le réticulum endoplasmique (RE). Elle est ensuite clivée en GP1, GP2 et

SSP, puis adressée à la membrane plasmique par les voies d'exocytose [28].

**Assemblage et Bourgeoisement** Les particules virales des Arénavirus s'assemblent à la membrane plasmique, où sont adressées les GP. La protéine Z a un rôle majeur dans l'assemblage : elle interagit avec le phosphatidylinositol de la membrane plasmique, GP, NP, L et les IGR [204, 162]. Ces interactions permettent de rassembler les composants du virion à la membrane plasmique. Pour certains Arénavirus, il semble que la NP joue un rôle dans l'adressage des RNP. Les protéines NP et Z de MOPV interagissent avec les protéines cellulaires ALIX/AIP1 (protéines associées au complexe ESCORT), ce qui facilite l'incorporation des RNP dans les particules virales [194].

Différentes protéines cellulaires sont nécessaires à l'assemblage et au bourgeoisement de différents Arénavirus. L'inhibition de la voie PI3K/Akt affecte le bourgeoisement de LCMV. Le récepteur intracellulaire ERGIC-53, qui intervient dans l'adressage de GPc, est nécessaire à la production de particules infectieuses de JUNV et LCMV [100]. ATP5B et IMPDH2 sont nécessaires au bourgeoisement de JUNV [229]. Les protéines cellulaires impliquées dans la formation des virions de LASV n'ont pas encore été identifiées.

La protéine Z a la capacité de se multimériser, et est suffisante pour produire des pseudo-particules virales (Virus-Like Particles, VLP). Cette multimérisation est à l'origine du bourgeoisement des virions à partir de la membrane plasmique. La membrane est ensuite coupée par un complexe cellulaire ESCORT-III et Vsp4, libérant la particule virale [204].

## 2.3 Propriétés des protéines virales

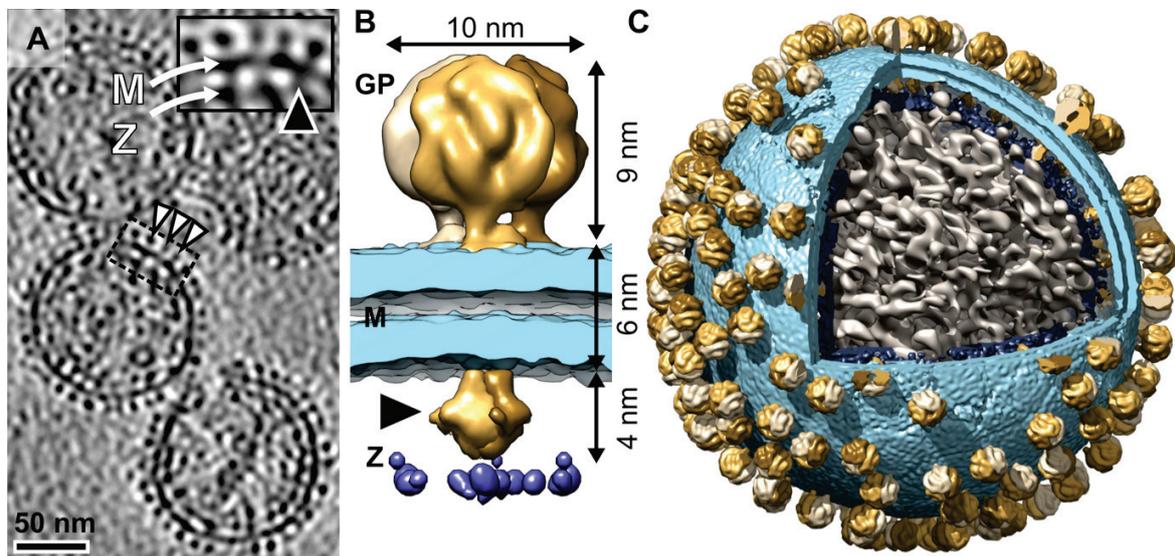
Les Arénavirus possèdent 4 protéines : GP, NP, Z et L. Ces protéines ont toutes un rôle dans le cycle cellulaire, dit rôle structural. Mais elles ont aussi des rôles non-structuraux, dont le contrôle de la réponse immune.

### 2.3.1 Glycoprotéine GP

**Expression et maturation** Le gène de la GP des Arénavirus code pour un polypeptide pré-GPc. Le clivage co-translationnel de pré-GPc produit la polyprotéine GPc (75 kDa) et le peptide signal SSP, qui restent associés. GPc est ensuite clivée en GP1 et GP2 par les protéases cellulaires SKI-1 et S1P (subtilisin kexin isozyme 1 et site 1 protease) [28]. GP1 et GP2 sont N-glycosylées à de multiples sites [115]. La présence du SSP influe sur l'adressage et la maturation de GPc, GP1 et GP2 [53]. Le complexe SSP/GP1/GP2 est ensuite adressé à la membrane plasmique par la voie d'exocytose. Il existe certaines variations dans ce processus de maturation selon les Arénavirus. Par exemple, la protéine GPc de LASV est majoritairement clivée dans les voies de sécrétion, alors que celle de LCMV l'est dans les compartiments Golgi/post-Golgi [28].

**Structure et fonction** Les glycoprotéines d'enveloppe GP sont en fait des complexes GP1-GP2-SSP [186]. Les GP sont présentes à la surface des virions sous forme de trimères (Figure 1.10). GP1 est une sous-unité située à l'extérieur du virion et dont la fonction est l'attachement au récepteur. GP2, qui est transmembranaire, est une protéine de fusion de classe I [86]. Le SSP est impliqué dans la maturation de GP et l'interaction avec Z. Pour les Arénavirus de l'ancien monde, il a été montré que l'interaction GP1/ $\alpha$ DG dépendait des modifications post-traductionnelles de l' $\alpha$ DG, en particulier les O-mannosylations et les modifications LARGE-dépendantes [178]. La GP1 de LASV interagit aussi avec LAMP1, grâce à un trio d'histidines (His92; His93 et His230) conservées chez les Arénavirus de l'ancien monde [39]. Ces histidines ne sont accessibles qu'après un changement de conformation induit par la baisse du pH [111].

GP2 est une protéine de fusion de classe I, catégorie dont le modèle est l'hémagglutinine (HA) du virus Influenza. Deux régions N-terminales de la GP2 de LASV semblent impliquées dans la fusion, mais le peptide de fusion reste à identifier [213]. Les structures cristallographiques du complexe GP à différents pH, et donc à différentes étapes des processus d'entrée, ont été résolues [111]. La baisse du pH entraîne un changement de conformation des trimères de GP. La fixation au récepteur d'entrée modifie encore la structure du trimère, exposant le peptide de fusion. Le peptide de fusion interagit avec la membrane de l'endosome, et le basculement des GP vers une structure "Trimer-of-hairpins" (trimère d'épingles à cheveux, correspondant à des



**FIGURE 1.10: Structure de la glycoprotéine de LASV**

A) Tomographie 3D de particules de LASV. Sont indiquées 3 glycoprotéines (triangles blancs), la membrane (flèche M) et la matrice (flèche Z). B-C) Structure d'un trimère de GP associé à la membrane (B) et d'un virion de LASV (C). Les GP sont représentées en jaune, la membrane du virion en bleu clair, la matrice en bleu foncé et les RNP en gris. La flèche indique les queues intra-membranaires des GP. Issu de [111].

hélices  $\alpha$  enroulées) induit la fusion des membranes du virion et de l'endosome [213].

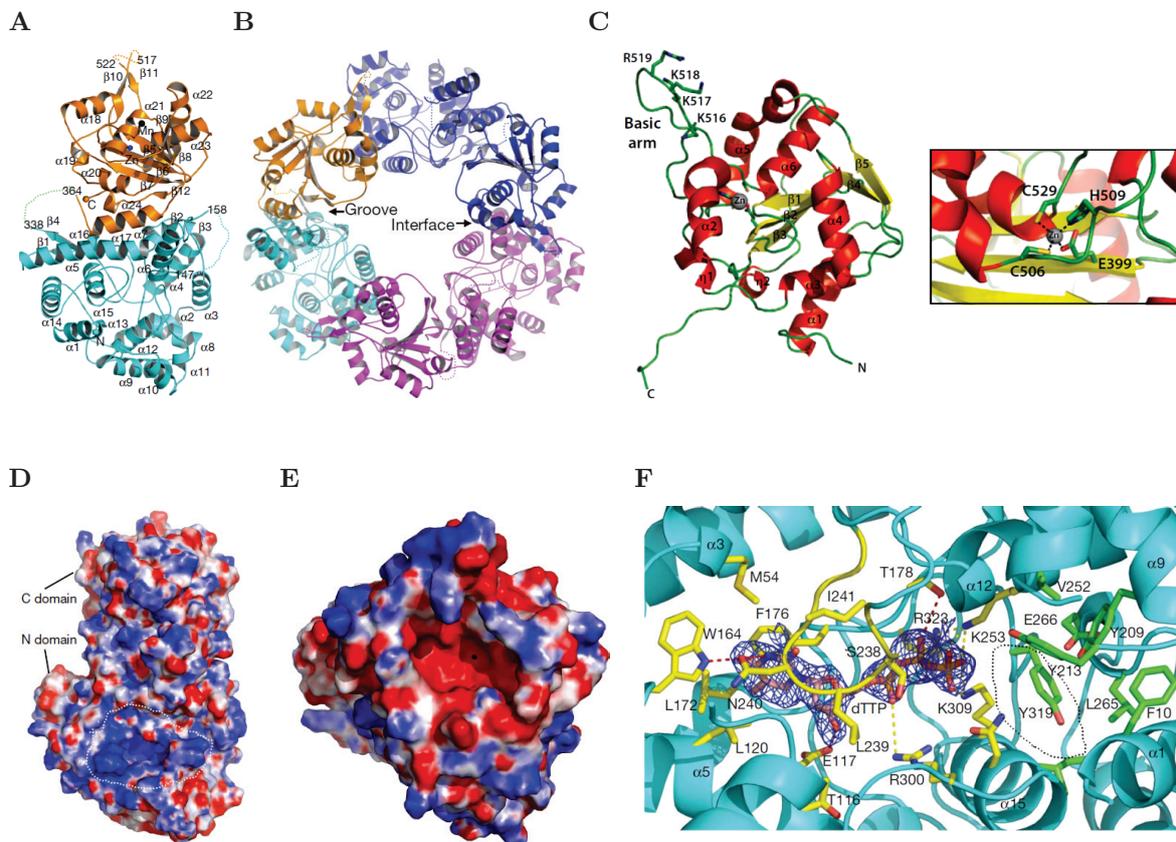
**Virulence** La GP a été identifiée comme un facteur de virulence pour différent Arénavirus. Au sein du clade B des Arénavirus du nouveau monde, l'utilisation de TfR1 varie selon les virus. Les virus pathogènes sont capables d'utiliser TfR1 humain, alors que les virus non pathogènes peuvent uniquement utiliser la version murine comme récepteur [230]. De plus, une simple mutation dans la GPc de JUNV, qui impacte l'efficacité de fusion, est impliquée dans la virulence chez l'homme [51]. Pour les Arénavirus de l'ancien monde, des différences d'affinité pour l' $\alpha$ DG ont été identifiées entre les souches de LCMV. La souche C113, qui a une haute affinité pour l' $\alpha$ DG, est capable d'inhiber la réponse T et d'établir une infection chronique. La souche Armstrong, dont l'affinité pour l' $\alpha$ DG est plus faible, est rapidement éliminée par la réponse T [103, 197]. Enfin, la sur-représentation parmi les populations du Nigeria d'allèles impactant la maturation de l' $\alpha$ DG suggère que l'altération de l'interaction GP/ $\alpha$ DG est un facteur de résistance à LASV [3].

### 2.3.2 Nucléoprotéine NP

**Rôle structural** La NP des Arénavirus, protéine de 63 kDa, est la protéine présente en plus grande quantité dans les cellules infectées. Elle interagit avec l'ARN génomique pour former des RNP, et est nécessaire à la transcription/réplication virale. Elle est composée de deux domaines globulaires (N-ter et C-ter) séparés par une boucle désordonnée (Figure 1.11A) [167]. *In vitro*, les NP forment des trimères (Figure 1.11B et 1.12) [80]. L'interaction avec un ARN simple-brin (comme le génome viral) induit un changement de conformation de la NP, vers une conformation dite "ouverte". Dans cette conformation, les NP peuvent se multimeriser (Figure 1.12). Cette interaction NP/ARN et NP/NP est à l'origine de la formation de RNP virales. L'association de la NP avec la protéine L dans les RNP nécessite la présence de séquences spécifiques d'ARN viral, situées dans les extrémités 3' et 5' non codantes [90]. Le domaine N-ter de la NP est aussi impliqué dans les processus de transcription. En effet, ce domaine possède une cavité chargée positivement capable d'interagir avec la coiffe m7GpppN des ARNm cellulaires (Figure 1.11F) [167]. Cette structure est impliquée dans le vol de coiffe nécessaire à la synthèse d'ARNm viraux. Le domaine C-ter de la NP a lui aussi un rôle structural. Il a été montré pour LCMV et MOPV que ce domaine est capable d'interagir avec la protéine Z (directement ou indirectement) [193, 153]. Cette interaction semble essentielle pour l'adressage des RNP à la membrane plasmique et leur incorporation dans les virions néo-synthétisés.

**Rôle non-structural** La NP a un rôle fondamental dans l'immunosuppression et l'immunoévasion par les Arénavirus. L'analyse de la structure de la NP de LASV a montré une correspondance structurale avec les protéines cellulaires de la superfamille des exonucléases (ExN) à DEDDh [78]. Le site actif de ces DDED est composé de

résidus Asp-Glu-Asp-Asp (DEDD), associés spatialement à une histidine (h). Outre les similarités structurales, les résidus D389, E391, D533, et H528 de la NP de LASV se superposent parfaitement avec D1, E2, D4 et h des ExN DEDDh (Figure 1.11C). Ce site ExN de la NP forme une cavité chargée négativement et qui coordonne un ion  $Mn^{2+}$  (Figure 1.11E). Le site exonucléasique de la NP de LASV est capable de digérer les ARN double-brin (ARNdb), avec une spécificité de substrat très stricte. La capacité de la NP à inhiber la voie IRF est dépendante de ce domaine [79]. Dans le cadre d'une infection virale, l'ARNdb est un activateur de la réponse innée. La digestion de l'ARNdb par la NP de LASV permet au virus d'échapper à la détection

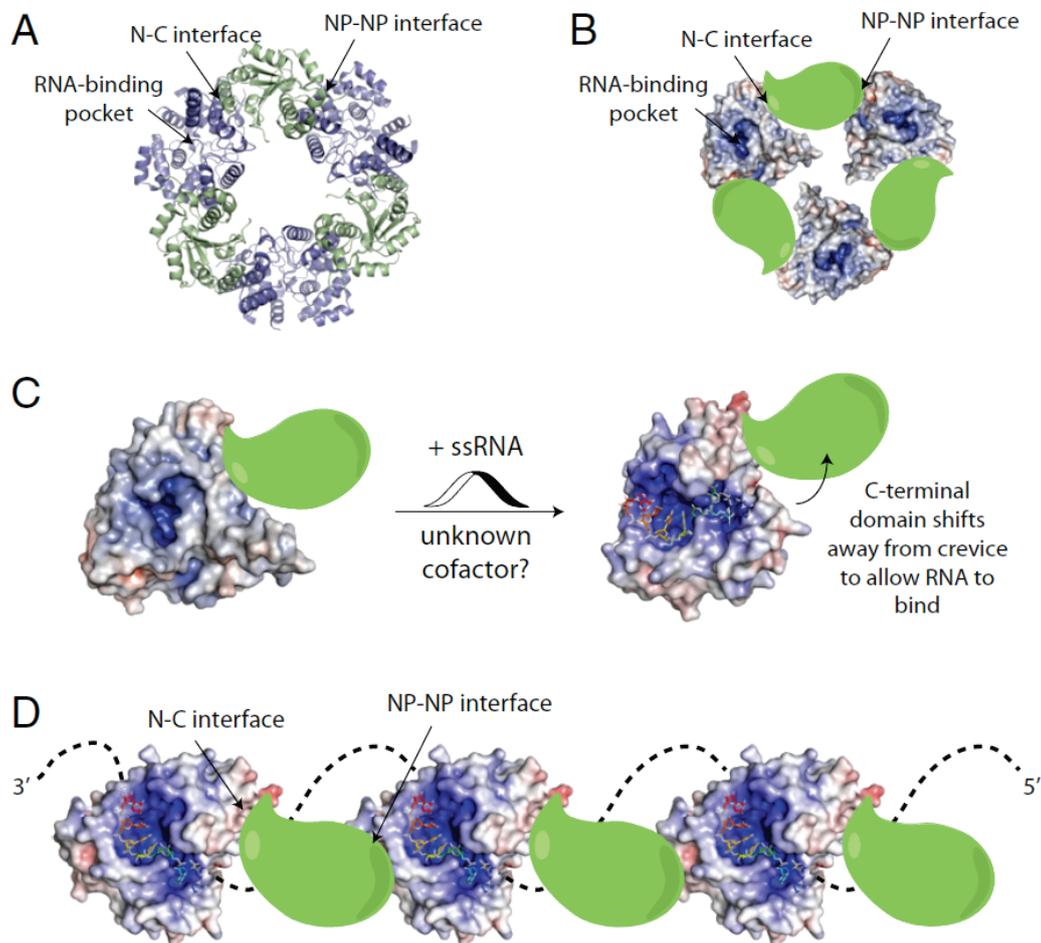


**FIGURE 1.11: Structure de la nucléoprotéine de LASV**

**A)** Modélisation de la structure de la NP de LASV. Le domaine N-ter est coloré en bleu et le domaine C-ter en orange. Le point noir représente l'ion  $Mn^{2+}$  et le point bleu l'ion  $Zn^{2+}$ . Les boucles désordonnées sont en pointillés. **B)** Structure d'un trimère de NP (une protéine en bleu/orange, une en bleu foncé et une en mauve). **C)** Modélisation de la structure du domaine C-ter de la NP de LASV et coordination du Zinc. Ce domaine a une fonction ExN impliquée dans l'immunosuppression induite par LASV. **D-E)** Cartographie des potentiels électrostatiques de la NP (D) et de la cavité 3'-5' ExN (E). La ligne blanche pointillée délimite la poche de cap-binding et le point noir l'ion  $Mn^{2+}$ . **F)** Interaction entre un analogue de coiffe (dTTP, en bleu) et la cavité cap-binding du domaine N-ter de la NP. A, B, D, E et F sont issus de [167], C est issu de [78].

par RIG-I et donc de ne pas induire une réponse immunitaire innée [174].

La capacité de la NP à inhiber la translocation de IRF3 et la réponse IFN $\beta$  est commune à tous les Arénavirus, à l'exception de TACV [129]. Le domaine DEDDh est aussi conservé chez tous les Arénavirus, et sa capacité à digérer les ARNdb a été montré pour LASV, MOPV, TACV et Pichinde (PICV) [191, 35]. La mutation de ce domaine catalytique réduit la capacité des virus à inhiber la réponse IFN $\beta$ . Ces données suggèrent que le mécanisme de digestion des ARNdb, qui évite la détection par RIG-I et la production d'IFN-I, est commune à tous les Arénavirus. D'autres mécanismes d'inhibition de la réponse immune sont possibles. Par exemple, le domaine ExN de la NP de LCMV et LASV est capable d'interagir avec IKK $\epsilon$ , bloquant la phosphorylation de IRF3 [166]. JUNV est capable de séquestrer les PKR cellulaires, ce qui inhibe la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la suite de la voie d'activation PKR [99].



**FIGURE 1.12: Modèle d'interaction NP/ARN et de multimérisation de la NP des Arénavirus**

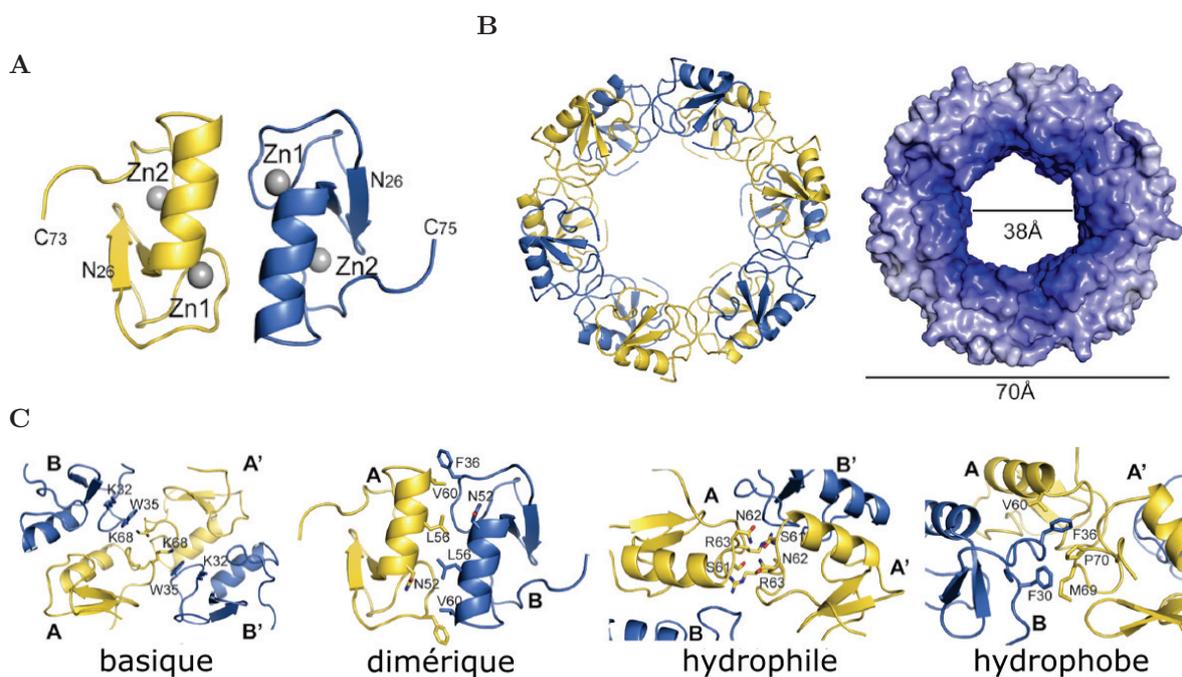
**A-B)** Organisation d'un trimère de NP de LASV "fermées" ou "ARN-free", représenté par les modèles structuraux des 3 NP (A) ou la carte électrostatique du domaine Nter et un dessin (vert) du domaine Cter (B). **C)** Changement de conformation de la NP lors de la fixation d'ARN simple brin. **D)** Formation de RNP par interaction des NP avec l'ARN simple brin et les deux NP adjacentes. Issus de [80].

### 2.3.3 Protéine de matrice Z

**Structure et organisation** La protéine Z est la plus petite protéine des Arénavirus (11 kDa). Chez tous les Arénavirus, elle comporte 3 domaines conservés [58] :

- un site de myristoylation **G2** en N-ter. La glycine située en position 2 est modifiée post-traductionnellement par une enzyme cellulaire (N-myristoyl transferase), qui lie de manière covalente un groupement myristate (14 aa).
- un domaine **RING** central. Ce domaine d'environ 60 aa, très ordonné, est composé d'une hélice  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ . Il contient un motif central CHC qui coordonne deux cations  $Zn^{2+}$  (Figure 1.13A). Chez certains Arénavirus, le domaine RING contient un motif tardif YxxL.
- un domaine **tardif** en C-ter. Ce domaine de 4 aa peut être P[T/S]AP, PPxY, ou YxxL et est impliqué dans les interactions avec les protéines virales ou cellulaires. La Z de certains Arénavirus possède deux domaines tardifs.

La protéine Z a la capacité de s'oligomériser (Figure 1.14) [81]. Pour l'instant, les formes de la Z de LASV qui ont été identifiées sont le monomère, le dimère et le dodécamère. Le dodécamère forme une structure en anneau dont le centre est fortement basique, et est dépendant de trois acides aminés du domaine RING (LysTrpLys). La



**FIGURE 1.13: Structure de la protéine de matrice Z de LASV**

**A)** Dimère asymétrique de Z. Seuls sont représentés les résidus 26 à 73 pour le monomère A (jaune) et les résidus 26 à 75 pour le monomère B (bleu). Les ions  $Zn^{2+}$  sont indiqués en gris. **B)** Représentation d'un dodécamère de Z en modélisation structurale et en carte de potentiel électrostatique (potentiel positif en bleu). **C)** Quatre types d'interactions des oligomères de Z. Issu de [81].

variété des multimères de Z pourrait être liée à ses nombreux rôles.

**Rôle structural** Les propriétés d'oligomérisation de la Z sont liées au bourgeonnement des particules virales. En effet, la Z de LASV, LCMV, MOPV, JUNV, MACV et TCRV suffit à la formation de VLP [204]. La Z des Arénavirus rentre donc dans la catégorie des protéines de matrice. Cette activité de bourgeonnement est liée au domaine tardif, et il a été montré pour LASV que la voie MVB (multivesicular bodies, avec les protéines Vsp4A, Vps4B, et Tsg101) était impliquée [203]. L'assemblage des particules virales est dépendant du site G2, du domaine RING et du domaine tardif de la Z. L'absence de myristoylation du site G2 inhibe la production de particules virales chez les Arénavirus de l'ancien monde et du nouveau monde [161]. G2 est impliqué dans l'interaction entre la Z et le peptide SSP de la GP, et est donc nécessaire à l'assemblage des particules virales [32]. Chez d'autres virus, le groupement myristate interagit avec le phosphatidylinositol membranaire et favorise l'assemblage, mais ça n'a pas été démontré pour les Arénavirus. Le domaine tardif de la Z situé en C-ter peut interagir avec les protéines du complexe ESCRT. La protéine cellulaire impliquée varie selon le type de domaine et le virus : P[T/S]AG avec Tsg101, PPxY avec Need4 et YxxL avec Alix/AIP1 [220]. LASV possède ces trois sites, P[T/S]AG et PPxY en C-ter, YxxL dans le domaine RING. Cependant, seul Tsg101 est nécessaire au bourgeonnement des particules virales [203]. Le site YxxL situé au sein du domaine RING est quant à lui impliqué dans le recrutement des RNP : Alix/AIP1 interagit avec le domaine YxxL de la Z mais aussi avec la NP, facilitant l'incorporation des RNP dans les particules virales [193].

**Rôle non-structural** La contribution de la Z aux différents mécanismes d'immunogénicité et d'immunosuppression est encore en cours d'étude. Il est aujourd'hui assez bien établi que la Z inhibe la réplication/transcription, grâce à son domaine RING, et induit la transition vers les phases tardives du cycle viral [43]. Il a été montré que la protéine Z de LASV, LCMV, MACV et JUNV interagit avec la L, inhibant son activité ARNpol [102]. Le complexe Z-L se fixe sur le promoteur viral dans un état inactif. Cette interaction permet le passage de la phase de réplication/transcription à la phase de maturation/assemblage. Elle peut aussi faciliter l'empaquetage des RNP dans les particules virales lors de l'assemblage. Le domaine RING interagit avec eIF4E et inhibe sa fonction en diminuant son affinité pour les coiffes ARN [207]. L'interaction Z/eIF4E peut aussi être impliquée dans la régulation de la réponse IFN-I, car la transcription de IRF7 est influencée par le ratio eIF4E-binding protein/eIF4E [40]. Dans le cas des Arénavirus du nouveau monde (GTOV, JUNV, MAVC et SABV), il a été montré que Z interagissait avec RIG-I [56]. Cette interaction perturbe l'interaction RIG-I/MAVS, inhibant l'activation de IRF3, NF $\kappa$ B et la réponse IFN $\beta$ . Les protéines Z de LCMV et LASV ont été testées dans cette étude, mais n'interagissaient pas avec RIG-I. Une autre étude a conclu que la protéine Z des Arénavirus pathogènes (LCMV, LASV, JUNV, MACV, SABV, GTOV, CHPV, Dnadenong, LUJV) mais pas de Arénavirus

non pathogènes (MOPV, MOBV, TCRV, PICV, Ippy, Amapari, Pirital) était capable d'interagir avec RIG-I, mais ces travaux sont controversés [223].

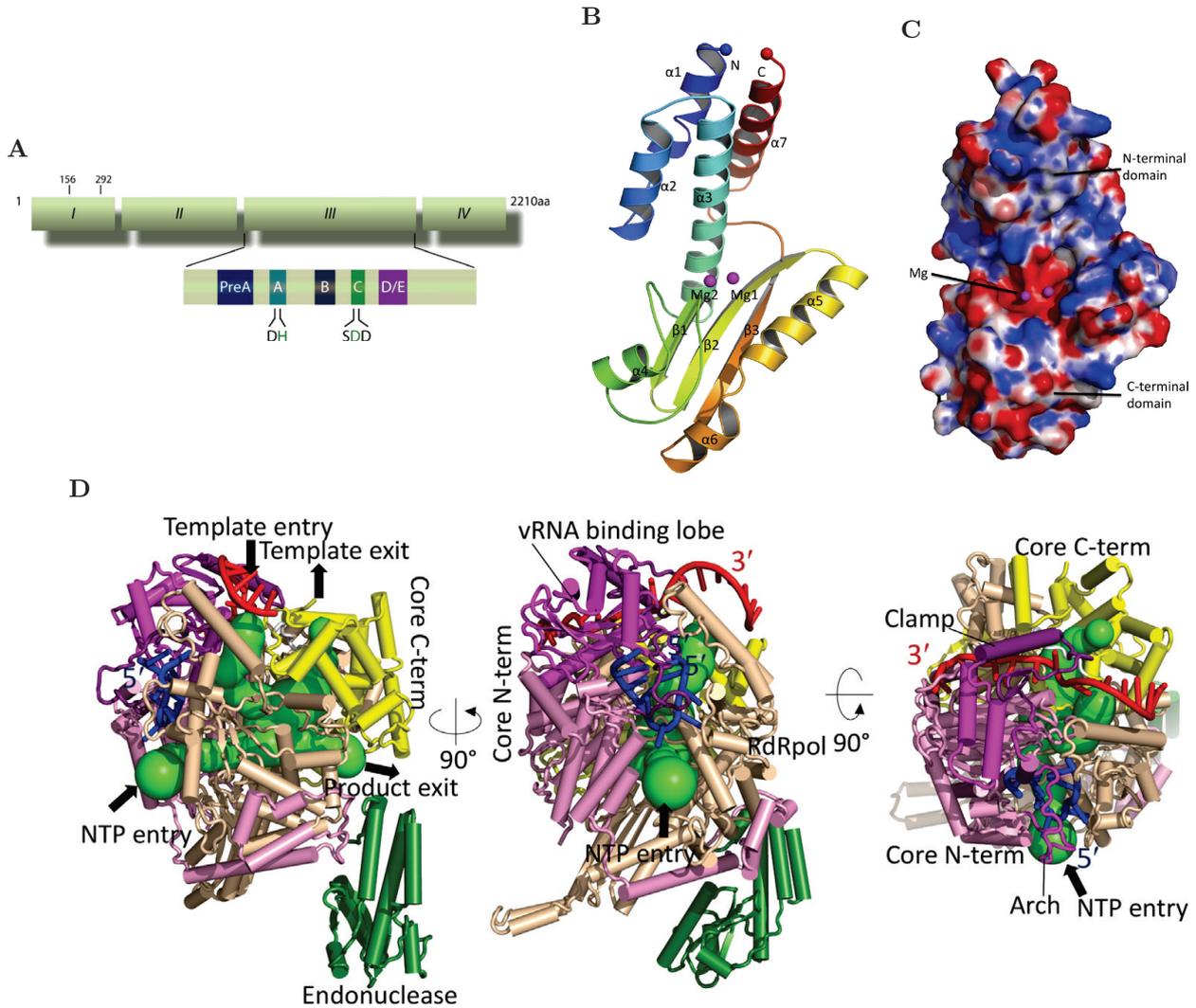
### 2.3.4 ARN-polymérase ARN-dépendante L

**Structure** La L est la plus grosse protéine des Arénavirus : 200 kDa. C'est une ARNpol ARN-dépendante monomérique. La comparaison de la séquence de la L des Arénavirus avec celles d'autres virus à ARN négatifs a permis d'identifier 4 domaines conservés (I à IV) liés par des régions variables (Figure 1.14A) [113]. Cette organisation par domaine a été confirmée par microscopie électronique pour le virus MACV [101]. L'obtention d'une ARNpol fonctionnelle en transfectant séparément des domaines de la L de LCMV va aussi dans ce sens. Les interactions de la L avec d'autres protéines, virales ou cellulaires, sont peu décrites. L'interaction de la L avec la NP semble se faire via l'ARN [90]. Des études sur LCMV suggèrent aussi une oligomérisation de la L [198].

**Fonction ARN polymérase** Le domaine catalytique de l'ARNpol est situé dans le domaine III. Il possède la même structure paume/doigts/pouce que les ARNpol des autres virus à ARN négatifs, dont celle du virus Influenza qui est très bien décrite [59]. On y trouve aussi les motifs préA, A, B, C et D/E, typiques du site catalytique des ARNpol (Figure 1.14A). Les domaines II et IV sont structurés autour du domaine III pour former le cœur globulaire de l'ARNpol. Aucune structure haute résolution de la L des Arénavirus n'a été obtenue, mais l'analyse des séquences suggère qu'elle est proche de celle des Bunyavirus. La structure de la L du virus LaCrosse, obtenue en 2015, est utilisée comme modèle pour celle des Arénavirus [67, 59]. La structure complète de la L du virus LaCrosse est illustrée en figure 1.14D. On y observe la forme globulaire du cœur, constitué des domaine II, III et IV, et le domaine Nter (I) indépendant, lié au cœur par une séquence flexible. Le cœur forme une cavité (sphères vertes) avec 4 accès. Les connaissances sur le fonctionnement d'autres ARNpol suggèrent que chacun de ces canaux a un rôle différent : entrée des NTP, entrée de la matrice ARN, sortie de la matrice ARN et sortie de l'ARN néosynthétisé. La sortie de la matrice et de l'ARN néosynthétisé par deux canaux différents permet d'obtenir un génome ARN simple brin. La distance entre l'entrée et la sortie des ARN viraux est faible, ce qui permet une lecture de l'ARN copié au sein des RNP, sans restructuration importante [59]. L'interaction de la L avec les extrémités 3' et 5'-UTR de l'ARN viral induit un changement de conformation du site actif, nécessaire à l'activité ARNpol ARN-dépendante. Cette interaction est séquence-spécifique pour l'ARN et structure-spécifique pour la L, permettant une certaine variabilité [77].

**Fonction endonucléase** Le domaine N-ter (I) de la L des Arénavirus a une fonction particulière. C'est un domaine EdN. Sa structure, à deux lobes, consiste en un feuillet  $\beta$  entouré de deux hélices  $\alpha$  (Figure 1.14B et 1.14C) [210]. Elle est identique

au domaine EdN décrits chez les polymérases des autres virus à ARN négatifs (Influenza et LaCrosse). Le site actif, situé entre les deux lobes, coordonne deux cations métalliques bivalents. Chez la majorité des EdN virales, les résidus catalytiques, qui coordonnent ces ions, forment un domaine HPD[E/D]XK. Chez LASV, les résidus D89,



**FIGURE 1.14: Structure de la polymérase L des Arénavirus**

**A)** Organisation des domaines de la L des Arénavirus **B-C)** Structure (B) ou carte des potentiels électrostatiques (C) du domaine de vol de coiffe de la protéine L de LASV. Les ions magnésium coordonnés sont indiqués en rose. **D)** Structure de l'ARNpol ARN dépendante du virus LaCrosse (Bunyavirus). C'est la première structure haute résolution de la protéine L d'un virus ARN négatif segmenté. La comparaison de la séquence de cette protéine L avec celle des *Arenaviridae* suggère une structure similaire. Le domaine ARN-polymérase (III) est représenté en beige, les domaines N-ter et C-ter du noyau (II et IV) en rose et en jaune, et le domaine EdN (I) en vert. Les ARN viraux sont représentés en rouge (3') et en bleu (5'). Les sphères vertes représentent les cavités du domaine ARNpol. A issu de [113], B et C issus de [210], D issu de [59].

E102 and K122 sont conservés, mais pas l'histidine catalytique [210]. Le domaine EdN de la L des Arénavirus appartient à la famille *His-*, caractérisée par une coordination non-canonique des cations métalliques [59].

La capacité EdN est impliquée dans la transcription. Elle est nécessaire au mécanisme de vol de coiffe des ARNm cellulaires, qui initie la transcription des ARNm viraux. Le domaine EdN de la L de LASV est très peu efficace *in vitro* [173]. C'est une caractéristique commune à tous les domaines EdN de la famille *His-*. Cependant, l'absence d'activité EdN nuirait fortement aux capacités de réplication de LASV. Le domaine EdN de la L des Arénavirus est donc fonctionnel *in vivo*, mais il semblerait que son activité soit hautement régulée et nécessite une protéine complète [59].

**Évolution et virulence** Mis à part son rôle dans la transcription/réplication, la L des Arénavirus a très peu été étudiée. Des études récentes d'évolution de LASV ont montré qu'elle était soumise à de fortes pressions de sélection. L'alignement de séquences de divers Arénavirus de l'ancien monde, isolés chez l'homme ou chez le rongeur, a permis d'identifier les sites sélectionnés positivement au cours de l'évolution de LASV [163]. La majorité de ces sites sont situés dans le gène de la L, et sont entourés de résidus hautement conservés. Ainsi, la L des Arénavirus, et de LASV en particulier, est un déterminant majeur dans l'évolution de ces virus.

Des études menées sur LCMV ont aussi montré que la L était un facteur de virulence. Un résidu de la L (L1079) est différent entre la souche C113, responsable d'infections aiguës chez la souris, et de la souche Armstrong, responsable d'infections chroniques [191]. Ce résidu est impliqué dans la meilleure réplication intracellulaire de la souche C113, donc une charge virale plus élevée, qui est chez les Arénavirus un marqueur de sévérité. Le rôle de la L dans la virulence a aussi été montré pour LASV et PICV. Les résidus de la L impliqués dans l'amélioration de la réplication virale et l'augmentation de la virulence chez LCMV, LASV et PICV n'appartiennent pas au domaine catalytique, et les mécanismes par lesquels ils impactent la virulence sont encore inconnus [191]. En transfection, il a aussi été montré que la L de MOPV activait la voie RIG-I/MAVS, et que cette activation était dépendante de l'activité ARNpol [226].

Les Arénavirus sont donc une famille assez hétérogène sur le plan de la biologie moléculaire. Si l'organisation globale des virions et des génomes est conservée, les mécanismes du cycle viral et les propriétés des protéines virales varient d'un virus à l'autre. Comme la famille des Arénavirus contient des virus pathogènes et non pathogènes pour l'homme, de nombreuses équipes ont cherché des déterminant moléculaires de la pathogénicité. Pour l'instant, la majorité des différences sont liées à la phylogénie (ancien monde/nouveau monde) et non au caractère pathogène. Cependant, les nombreux rôles des quatre protéines virales ne sont pas encore tous identifiés. De plus, les impacts *in vivo* de ceux qui sont connus ne sont pas complètement élucidés.

## 3 Réponse immune aux Arénavirus

Parmi les Arénavirus, la réponse immunitaire à LCMV est extrêmement bien décrite. En effet, l'infection par LCMV chez la souris est utilisée comme modèle d'étude. De nombreux mécanismes immunologiques ont été décrits à partir de ce modèle : restriction du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), LT mémoires, infection persistante, ... [228]. L'utilisation de différentes souches de LCMV a permis d'étudier les infections aiguës [136] et les infections chroniques [145]. Cependant, la pathogénèse de LCMV chez l'homme (et chez la souris) est très éloignée de celle des autres Arénavirus pathogènes. Si les études sur LCMV peuvent constituer une base pour l'analyse des mécanismes moléculaires de réponse aux fièvres hémorragiques à Arénavirus (FHA), elles ne sont pas forcément représentatives.

Comme pour de nombreuses FHV, le rôle de la réponse immunitaire aux FHA est mal connu. Une réponse immunitaire spécifique et efficace est nécessaire pour éliminer le virus. Une réponse immunitaire tardive et dérégulée semble être impliquée dans les dommages tissulaires, et donc dans la pathogénèse. La compréhension des mécanismes immuns mis en œuvre au cours des FHA, et en particulier LASF, est essentielle.

### 3.1 Moyens d'étude

LASF a pu être décrite chez l'homme grâce à des études cliniques réalisées dans les zones d'endémie. Cependant, l'accès aux patients infectés par LASV est limité, compliquant ces études de ce genre. Afin de comprendre les mécanismes mis en œuvre au cours de LASF, un certain nombre de modèles d'études de LASV, et des autres Arénavirus, ont été développés. Ces modèles sont couramment utilisés, tant pour des études fondamentales et que pour les tests pré-cliniques de nouvelles thérapies.

#### 3.1.1 Études *in vitro*

**Virus** L'étude de virus pathogènes implique des contraintes importantes de biosécurité. Dans les cas des Arénavirus responsables de FHV, leur manipulation nécessite un confinement de niveau 4. Les souches de virus sauvages utilisées dans les laboratoires ont majoritairement été isolées à partir de prélèvements de patients. La souche Josiah de LASV, utilisée dans de nombreuses études, a été isolée en 1976 à partir du sérum d'un patient [221]. La souche AV, utilisée dans notre laboratoire, a été isolée en 2000 chez un cas importé en Allemagne [69]. Des systèmes de génétique inverse ont été développés pour certains virus. Pour LASV, la génétique inverse a permis d'élucider le rôle du domaine ExN de la NP [34]. Pour MACV, elle a permis d'obtenir un virus fluorescent, à partir d'une base trisegmenté (segment S dédoublé pour exprimer la NP et la GP sur deux segments différents, libérant deux ORF) [54]. En France, les études sur les virus pathogènes pour l'homme sont encadrées par la réglementation MOT (micro-organismes et toxines). La liste des virus concernés inclut tous les Arénavirus

responsables de FHV. Cette réglementation concerne la détention, la mise en œuvre et l'acquisition/cession de tout matériel génétique de plus de 500 paires de bases (pb) appartenant à un micro-organisme listé. Du fait des diverses contraintes, de biosécurité et réglementaires, inhérentes à la manipulation de ces virus, peu d'équipes de recherches les utilisent. De nombreuses études se limitent aux Arénavirus non pathogènes, ou à des techniques *in vitro* qui ne requièrent pas de virus vivants.

**Gènes et protéines virales** Les études structurales ou mécanistiques utilisent rarement des virus. La majorité sont réalisées à partir de protéines virales purifiées ou exprimées par transfection *in vitro*. C'est le cas des études de cristallographie : pour obtenir la structure de la Z de LASV, un plasmide codant pour la Z de LASV Josiah a été transfecté, et les protéines ainsi exprimées ont été purifiées [81]. De même, pour les études d'interaction de la GP de LASV, c'est une GP recombinante qui a été utilisée [39]. Pour les études de réplication/transcription virales, un système minigénome a été développé [76].

L'utilisation de vecteurs viraux portant des protéines d'Arénavirus pathogènes a permis d'étudier ces protéines dans un contexte d'infection, sans les contraintes de la manipulation de virus hautement pathogènes. Par exemple, un vecteur LCMV portant les GP de différents Arénavirus a été utilisé pour étudier la permissivité de cellules immunitaires [91].

**Cellules** Outre les virus, différents types de cellules sont utilisés dans les laboratoires de recherche. Les Arénavirus peuvent infecter de nombreux types cellulaires, ce qui laisse un large choix de cellules immortalisées ou primaires. Pour les études en transfection et ne nécessitant pas des mécanismes cellulaires très physiologiques, les cellules 293T restent les plus courantes. Selon les besoins, il existe des lignées cellulaires humaines ou murines, dont la biologie cellulaire est plus ou moins proche de ce qui se passe *in vivo*.

Pour des études nécessitant des environnements plus complexes, des équipes ont développé des systèmes *ex vivo*. C'était nécessaire pour les études sur cellules immunitaires, car les lignées correspondantes ne sont pas forcément de bons modèles. La différenciation de monocytes primaires en MP ou DC a été largement utilisée pour étudier la réponse aux Arénavirus [9, 154, 11], mais certains travaux ont été réalisés directement avec des cellules primaires (pDC [91], NK [181]). Le développement de systèmes complexes *in vitro* pourrait être un outil intéressant. La polarité de l'infection des voies aériennes par LASV a été étudiée grâce à des épithéliums pulmonaires reconstitués [139]. Les modèles de foies *in vitro* pourraient aussi être utiles aux études sur les FHA [75].

### 3.1.2 Modèles animaux

**Rongeurs** Pour des raisons techniques et éthiques, le modèle animal le plus utilisé est la souris. Comme mentionné précédemment, l'infection de souris par LCMV a été largement étudiée. Cependant, LCMV reste un cas particulier au sein des Arénavirus pathogènes, et ces résultats ne peuvent pas être généralisés.

L'infection naturelle de souris par LASV est asymptomatique. Des études se sont intéressées à l'infection de *M. natalensis* par LASV, afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce réservoir [70]. Le modèle *M. natalensis* est intéressant pour des études sur l'écologie de LASV. Cependant, le virus étant toléré chez ce réservoir sans induire de signes cliniques, il n'est pas pertinent pour les études de pathogenèse. Divers modèles souris ont été développés, en modifiant les méthodes d'infection ou les souris elles-mêmes (Table 1.3). Chez les souris CBA ou SWR/J, l'infection intra-cérébrale par LASV induit perte de poids, altérations comportementales et 80 à 100% de mortalité [205]. Cependant, la progression de la maladie ne correspond pas à celle observée chez l'homme, et est plus proche d'une infection par LCMV. D'autres études ont utilisé des souris déficientes pour les récepteurs à l'IFN  $\alpha, \beta, \gamma$  (IFNAR) [175]. L'infection par LASV de ce modèle induit une mortalité de 100%, une infection systémique et des atteintes hépatiques. Ces souris IFNAR-KO reproduisent une partie des symptômes de LASV, et ont été utilisées pour l'étude de la réponse T. Cependant, la déplétion de la réponse IFN, une branche majeure de la réponse antivirale, diminue la pertinence de ce modèle. Pour l'améliorer, des souris IFNAR-KO ont été transplantées avec de

Modèle animal		Infection	Mortalité	Symptômes	Réponse immune	Refs
Primate non humain	Singe rhésus	systémique	50%	fièvre, atteintes pulmonaires et hépatiques, hémorragies modérées		[30, 70]
	Singe Cynomolgus	systémique	50-100%	fièvre, atteintes pulmonaires et hépatiques, hémorragies modérée	cellulaire, cytokines, Ac	[205, 10]
	Marmouset	systémique	100%	fièvre, atteintes hépatiques		[36]
Souris	CBA ou SWR/J	tissus	80-100% si i.c.	modérés		[205]
	IFNAR KO	systémique	100%	atteintes hépatiques		[175]
	IFNAR KO + transfert de moelle	systémique	100%	fièvre, atteintes hépatiques, hémorragies	cellulaire, cytokines	[146]
	<i>M. natalensis</i>	chronique	x	x	x	[70]
Cobaye	S13	systémique	100%	lésions poumon, rein, rate	Ac	[70, 93]
	Harley	systémique	30%	lésions poumon, rein, rate	Ac	[205, 70]

TABLE 1.3: Modèles animaux utilisés pour l'étude de LASV

la moelle osseuse de souris sauvages [146]. Ces souris chimériques semblent reproduire certaines caractéristiques des cas sévères de LASF chez l'homme, dont la mortalité, l'infection systémique, les dommages hépatiques et la perméabilisation vasculaire. Ce modèle a été utilisé pour tester des traitements potentiels contre LASF, dont une combinaison ribavirine/favipiravir [147].

Un des premiers modèles rongeurs utilisés pour étudier les FHV est le cobaye. Les deux souches utilisées dans le cas des FHA sont la souche Hartley et la souche S13. Pour les Arénavirus du nouveau monde, le modèle hamster a aussi été utilisé. Le cobaye Hartley est largement répandu pour l'étude de l'infection par GTOV, mais semble moins pertinent pour LASF. La mortalité et la charge virale suite à l'infection par LASV sont plus importantes avec la souche S13 [93]. Les cobayes infectés par LASV présentent des lésions au niveau des poumons, des reins et de la rate, mais elles restent modérées comparées aux cas humains.

Ainsi le modèle rongeur peut être adapté à l'étude des FHA. Cependant, sa validité et sa pertinence sont limitées. Pour des tests fonctionnels spécifiques, des études préliminaires, des tests de traitements ou vaccins potentiels, les rongeurs peuvent apporter des informations intéressantes. Mais l'immunopathologie de LASF est difficilement reproductible chez le rongeur.

**Primates** De nombreux projets nécessitent l'utilisation d'un modèle primate. Malgré toutes les contraintes techniques, éthiques et financières inhérentes aux études primates, ce modèle reste le seul vraiment valable. Il permet une approche systémique de l'infection par LASV, de la réponse immune à l'infection et de la pathogenèse de LASF. L'infection de PNH par LASV se fait majoritairement par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intra-veineuse. Des inhalations de suspensions de particules virales, plus proches des voies naturelles d'infection, ont aussi été utilisées, mais elles impliquent des contraintes techniques et de biosécurité supplémentaires [124].

Par rapport à d'autres PNH, le ouistiti a l'intérêt d'être plus petit, et donc un peu moins contraignant. Ce modèle a été testé dans le cadre de l'infection par LASV [36]. Les ouistitis infectés ont présenté une infection systémique associée à une virémie élevée et sont morts en 15 à 20 jours. Les symptômes correspondaient à ceux de cas humains de LASF : fièvre, perte de poids, enzymes hépatiques élevées, nécrose hépatique multifocale et néphrite interstitielle. Ce modèle semble donc valide, mais il reste encore très peu utilisé, notamment à cause de l'absence d'outils immunologiques chez cette espèce. Un autre modèle a été mis au point afin de diminuer les contraintes : l'infection de macaques Rhésus par LCMV en intra-veineuse [116]. L'intérêt de ce modèle est qu'il utilise un virus moins pathogène, et qui peut être manipulé à un niveau de confinement moins strict. Dans ce modèle, l'infection est fatale et semble reproduire la pathogenèse de LASV. Ce modèle reste aussi peu utilisé.

La majorité des études primates sur LASV ont été réalisées sur deux espèces de PNH : les macaques rhésus [30] et cynomolgus [10]. Le taux de mortalité de LASF diffère selon la voie d'infection et la souche virale utilisée. L'infection est systémique,

avec une virémie élevée et la détection de virus dans de nombreux organes (foie, rate, glandes surrénales, reins, pancréas, ganglions lymphatiques, poumons, cerveau, ...). Les animaux présentent des symptômes proches de ceux observés chez l'homme : fièvre, léthargie, anorexie, et plus rarement conjonctivites, œdèmes de la face, pétéchies. Au niveau histologique, on observe des nécroses hépatiques et une pneumonie interstitielle. Les enzymes hépatiques (ASL/ALT) de singes cynomolgus infectées par LASV sont élevées au cours de la maladie. Certains singes rhésus présentent des défauts de coagulation. Les paramètres immunitaires impliqués dans LASF sont aussi cohérents avec eux observés chez l'homme : réponse IFN-I, réponse T, IL-6 [10, 119]. Les singes rhésus et cynomolgus restent le meilleur modèle *in vivo* pour l'étude de LASF.

### 3.1.3 Modèles de comparaison

**Fièvre de Lassa fatale/non fatale** Dans le but de développer des traitements efficaces, il est essentiel d'identifier les déterminants associés à la survie ou au décès des patients infectés par LASV. Connaître les facteurs corrélés à la survie peut permettre une amélioration de notre compréhension globale de la maladie, le développement de nouvelles pistes thérapeutiques et une meilleure prise en charge des patients. En effet, moduler la prise en charge des patients selon leurs facteurs de risque (facteurs corrélés au décès) pourrait diminuer la mortalité. Pour d'autres FHV, comme la fièvre à virus Ebola, une charge virale initiale élevée est corrélée au décès des patients [206], et ça semble aussi être le cas pour les FHA. Une large étude clinique, réalisée sur 5 ans au Nigeria et incluant 284 cas confirmés de LASF, avait pour but d'identifier des marqueurs associés au décès des patients [149]. Les données récoltées comprenaient des données démographiques (âge des patients), des paramètres physiologiques, des variables biochimiques et immunologiques, et les symptômes observés. L'analyse de ces données par régression multivariée a permis d'identifier des facteurs fortement corrélés à la mortalité : l'âge (plus de 50 ans), l'apparition de troubles nerveux, saignements et jaunisse, et des AST, créatine et potassium élevés à l'admission. Ces résultats sont à mettre en perspective, car la cohorte étudiée était assez homogène. Cependant, la corrélation de paramètres biochimiques à l'admission avec la mortalité est un outil très intéressant pour améliorer la prise en charge des patients infectés par LASV.

**Souches de LASV** Chez l'homme, l'issue de LASF est difficilement prédictible. Cette dimension aléatoire est incompatible avec les études en laboratoire, qui nécessitent reproductibilité et robustesse. Pour palier à cette difficulté, certaines équipes ont mis à profit la divergence entre les différentes souches de LASV. En effet, la virulence de LASV varie d'un isolat à un autre. Les différences de taux de mortalité entre les différentes épidémies de LASF en sont une illustration. Pour les études *in vivo*, la comparaison de différentes souches est un outil intéressant : par exemple, il a été montré que la souche Soromba-R, isolée au Mali, est moins pathogène chez le PNH [183]. Au laboratoire, nous avons observé que l'infection de singes cynomolgus par LASV Josiah

et AV donnait des résultats différents : si tous les animaux présentaient des symptômes de LASF, seuls les PNH infectés par la souche Josiah sont morts de la maladie (données non publiées). Étudier les différences physiologiques et immunologiques entre ces deux modèles de LASF peut permettre d'identifier des facteurs impliqués dans la survie ou le décès des PNH.

**Virus pathogènes/non pathogènes** Le modèle de comparaison LASV Josiah/LASV AV fonctionne *in vivo*, mais nous n'avons observé aucune différence *in vitro* entre ces deux virus (données non publiées). Nous utilisons donc un autre modèle : la comparaison de LASV et MOPV. MOPV a été isolé à partir de prélèvements réalisés sur des *M. natalensis* au Mozambique entre 1969 et 1976 [222]. Ainsi MOPV partage le réservoir de LASV, mais dans une zone géographique différente. Phylogénétiquement, MOPV est très proche de LASV (75% d'homologies entre leurs séquences d'acides aminés) [21]. L'infection préalable par MOPV chez les PNH induit une cross-protection contre l'infection par LASV, indiquant une proximité antigénique [98]. Cependant, contrairement à LASV, MOPV est non pathogène pour le PNH. Comme aucun cas humain n'a été répertorié, il est largement accepté que MOPV est non pathogène pour l'homme. Ainsi, MOPV et LASV sont deux virus très proches, mais avec des pathogénicités différentes. Comparer les facteurs viraux et immunitaires lors de l'infection par ces deux virus pourrait permettre d'identifier ceux qui sont impliqués dans la forte pathogénicité de LASV. D'autres équipes utilisent des couples différents Arénavirus pathogène/Arénavirus non pathogène (LASV/Mobala virus, JUNV/TACV, ...)

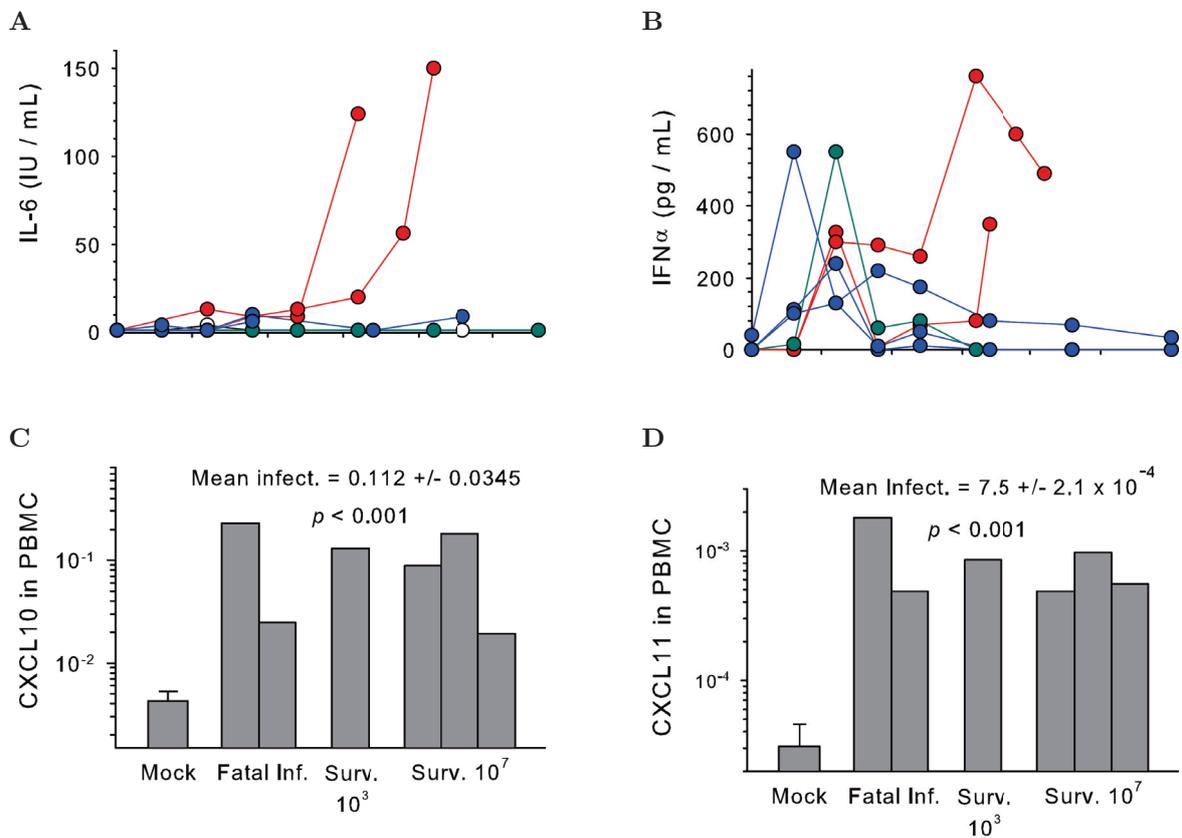
## 3.2 Réponse immunitaire innée

### 3.2.1 Cytokines, chémokines et IFN

**Cytokine storm** Comme expliqué précédemment (section 1.3), les dommages tissulaires observés au cours des FHV ne peuvent être expliqués par la réplication virale. Une composante délétère du système immunitaire semble à l'origine d'une partie des dommages. Cette observation a mené au développement du concept de *cytokine storm* (orage cytokinique) : une production dérégulée de cytokines (majoritairement pro-inflammatoires) qui serait à l'origine d'une partie des symptômes [16]. L'existence de ce *cytokine storm* a été confirmée chez les patients infectés par JUNV, mais est plus controversé dans le cas de LASF [135]. Le suivi de patients allemands infectés par LASV a permis de mettre en évidence un pic de production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  peu de temps avant la mort, mais ces données n'ont pas été confirmées par d'autres études.

**Cytokines pro-inflammatoires** De nombreuses cytokines et chémokines ont été quantifiées chez les patients et les PNH infectés par LASV. Chez l'homme, tous les patients infectés par LASV présentaient des niveaux élevés de d'IFN $\gamma$ , IL-12, IL-6 et de RANTES [122]. De manière surprenante, la quantité d'IL-8 et d'IP-10 était plus

élevée chez les cas de LASF non-fatales. Une autre étude a corrélé la survie des patients avec des niveaux faibles d'IL-6, IL-8, IL-10, MIP1 $\beta$  et CD40L [22]. Ainsi, si un certain nombre de cytokines sont produites par les patients infectés par LASV, leur rôle dans la réponse immune ou dans la physiopathologie n'est pas clair. Les études chez le singe cynomolgus ont permis une analyse plus poussée des cytokines produites. Parmi toutes les molécules testées, seules eotaxine, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL-10 et CXCL-11 ont été détectées chez les PNH infectés par LASV [208, 10, 82]. Et parmi ces cytokines, IL-6 était la seule à varier selon l'issue de la maladie : les PNH qui n'ont pas survécu à l'infection, mais pas les autres, présentaient cette élévation de la quantité d'IL-6 [10]. Ces résultats montrent que LASF est associée à la production de cytokines, mais de manière moins marquée que pour d'autres FHV. De plus, la majorité de ces cytokines ne semblent pas corrélées à l'issue de la maladie.



**FIGURE 1.15: Production d'IFN-I et de cytokines chez les singes cynomolgus infectés par LASV AV**

**A-B)** Quantification par ELISA de l'IL-6 (A) et de l'IFN $\alpha$  (B) dans le plasma des singes non infectés (blanc), infectés avec une forte dose (10<sup>7</sup> UFF, tous survivants, bleu), infectés avec une faible dose (10<sup>3</sup> UFF) et survivants (vert) ou décédés (rouge).

**C-D)** Quantification par RT-qPCR de CXCL10 (C) et de CXCL11 (D) dans les cellules mononucléées du sang périphérique des singes non infectés (mock), infectés avec une forte dose (Surv. 10<sup>7</sup>), infectés avec une faible dose et survivants (Surv. 10<sup>3</sup>) ou décédés (Fatal Inf). Issu de [10].

**IFN-I** La réponse IFN est extrêmement importante dans la réponse aux infections virales [184]. C'est une réponse très précoce, ce qui complique sa détection chez des patients atteints de FHV. *In vitro*, il a été montré qu'un traitement avec de l'IFN $\alpha$  ou de l'IFN $\gamma$  inhibait la réplication de LASV [4]. Chez la souris, inactiver la réponse IFN suffit à rendre les animaux susceptibles à l'infection par LASV [225]. Et chez le PNH, un pic très précoce d'IFN $\alpha$  a été observé chez les animaux qui ont survécu à l'infection par LASV [10]. Au contraire, chez les animaux décédés, l'IFN $\alpha$  augmentait tardivement. Ces données, ajoutées au rôle antiviral connus des IFN, suggèrent un rôle critique des IFN dans la réponse à LASV. D'après les données obtenues chez le PNH, les IFN-I seraient particulièrement importants.

### 3.2.2 Cellules Natural Killer

**Rôle des NK** Les cellules Natural Killer, ou NK, ont d'abord été décrites comme des lymphocytes ayant une activité anti-tumorale. Cependant, l'activité des NK est plutôt à classer dans la réponse innée. Les NK sont capables de lyser des cellules présentant les bons stimuli, en particulier des cellules tumorales. Le rôle antiviral des NK est moins bien défini. En effet, les personnes déficientes pour la réponse NK ne sont pas particulièrement susceptibles aux infections virales [18]. Les NK peuvent néanmoins jouer un rôle dans la réponse antivirale par la régulation de la réponse adaptative. Les NK produisent de l'IFN $\gamma$  qui est un régulateur majeur des LT. L'activation et l'activité cytolytique des NK sont aussi régulées par le dialogue avec les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

**Résultats expérimentaux** La réponse des NK à LASV a été étudiée *in vitro* grâce à la purification de NK primaires humaines. En présence du virus ou de DC immatures infectées, les NK n'étaient ni infectées ni activées [181]. Le même constat a été fait avec MOPV. En revanche, en présence de MP infectés par MOPV ou LASV, les NK présentaient un phénotype activé (régulation positive de CD69, NKp30 et NKp44, régulation négative de CXCR3) et proliféraient. Les NK activées produisaient du granzyme B et étaient capables de lyser des cellules K562 (lignée de cellules cibles des NK). Cette activation était dépendante du contact avec les MP infectés et de leur production d'IFN-I. Malgré leur activation, ces NK étaient incapables de lyser des cellules exprimant, en plus du signal cible K562, le CMH-I. Ainsi les MP infectés utilisés pour activer les NK étaient résistants à la lyse. L'interaction du CMH-I avec les KIR, récepteurs inhibiteurs des NK, pourrait expliquer cette résistance. Ainsi les CPA infectées par LASV *in vivo* pourraient échapper à la détection par les NK.

Chez les singes cynomolgus infectés par LASV, on observe une déplétion transitoire des NK circulantes [10]. Lors de l'infection par LCMV de singes rhésus, une déplétion des NK est aussi observée [176]. Cette déplétion peut être due à une mort des NK, à leur recrutement dans d'autres tissus, ou plus probablement à une combinaison des deux. Les PNH infectés par LASV présentent des taux élevés de CXCL9, CXCL10 et

CXCL11, qui sont des ligands de CXCR3. L'interaction de CXCR3 avec ses ligands pourrait induire une internalisation du récepteur et une relocalisation des NK vers les organes périphériques.

**Lien vers l'immunité adaptative** Les NK peuvent être impliquées dans l'induction de la réponse adaptative, en particulier la réponse T, via la production d'IFN $\gamma$ . Cependant, aucune production d'IFN $\gamma$  n'a été observée chez les patients infectés par LASV. *In vitro*, la stimulation des NK par des MP infectés par LASV induit la production d'ARNm d'IFN $\gamma$ , mais pas leur traduction [181]. Ainsi, malgré leur activation, les NK ne produisent pas d'IFN $\gamma$ . La production d'IFN $\gamma$  par les NK est induite par l'IL-12. Les CPA infectées par LASV ne produisent pas d'IL-12, mais produisent des IFN-I (en faible quantité). Or les IFN-I inhibent la production d'IL-12 par d'autres types cellulaires. La réponse des CPA à LASV pourrait donc expliquer l'absence de réponse IFN $\gamma$  par les NK *in vitro* et *in vivo* [180].

Si la réponse des NK à LASV semble modérée, ces cellules pourraient jouer d'autres rôles. Tout d'abord, l'activation des NK et leur relocalisation dans les organes périphériques pourrait être impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Dans le foie, elles pourraient être pro-inflammatoires. Dans les organes lymphoïdes secondaires, elles pourraient moduler le reste de la réponse immunitaire [180]. Il a été montré chez des souris infectées par LCMV que les NK étaient capables d'inhiber la réponse T CD8 [104]. Un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans le contrôle de la réponse immune par LASV.

### 3.2.3 Cellules Présentatrices d'Antigènes

Les CPA sont des acteurs majeurs de l'immunité innée, par la production de cytokines, la régulation de la réponse inflammatoire et le contrôle direct des infections virales. Elles ont aussi un rôle critique dans l'induction de la réponse adaptative, la présentation d'Ag par les CPA étant essentielle à la réponse des LT. Elles sont particulièrement intéressantes dans le cadre de LASV, car elles sont les premières cibles de LASV et un potentiel moteur de sa dissémination (voir section 1.3). Les CPA, aussi appelées cellules myéloïdes, sont composées de trois types cellulaires majeurs : monocytes, MP et DC.

**Monocytes** Les monocytes sont des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Ils peuvent répondre directement aux infections virales, mais aussi se différencier en MP ou en DC, du moins *in vitro*. L'infection de monocytes humains par LASV a été testée *in vitro*, et est non productive [117]. Le même constat a été fait à propos de l'infection par MOPV. L'absence de réplication virale de LASV et MOPV est associée à une absence de réponse des monocytes. D'autres Arénavirus se comportent différemment : les Arénavirus du nouveau monde TACV et JUNV répliquent dans des monocytes primaires humains [72]. Les titres de TACV obtenus étaient 10

fois inférieurs à ceux de JUNV. Les monocytes infectés par TACV produisaient des quantités importantes d'IL-6, IL-10 et TNF $\alpha$ , mais pas d'IFN-I et d'IL-12. Les monocytes infectés par JUNV ne produisaient aucune de ces cytokines. Ainsi, pour ces deux Arénavirus du nouveau monde, l'absence de réponse cytokinique des monocytes est corrélée à la pathogénicité du virus.

*In vivo*, l'activation des monocytes suite à l'infection par LASV a été testé chez le PNH. L'infection non-fatale par LASV était associée à l'activation des monocytes circulants (CD80+) [10]. Cette activation n'était pas détectée chez les PNH pour lesquels LASV était fatale.

**Macrophages** La différenciation de monocytes humains en MP rend ces cellules permissives à l'infection par LASV. Chez les PNH infectés par LASV, la majorité des MP des organes lymphoïdes secondaires sont infectés dès 7 jours p.i, ce qui pourrait être à l'origine de la charge virale importante dans ces organes [82]. *In vitro*, l'infection des MP par LASV est productive, même si la réplication virale reste faible [117]. Cette réplication modérée n'induit pas d'apoptose ou d'activation des MP [9]. Les MP infectés par LASV produisent de faibles quantités d'IFN-I, mais pas de cytokines pro-inflammatoires [155]. Si l'infection de MP par MOPV est aussi productive, la réponse des cellules est complètement différente : activation, production importante d'IFN-I et production de cytokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 et CCL13) [154, 155]. Ainsi le virus non-pathogène MOPV induit une activation importante des MP, contrairement au virus très pathogène LASV. Le traitement de MP avec du LPS ou du pIC induit la production d'IFN-I et inhibe la réplication de LASV. L'ajout d'IFN-I (mais pas d'IFN $\gamma$  ou d'IFN $\lambda$ ) inhibe aussi la réplication virale [11]. La réponse IFN est capable d'inhiber la réplication de LASV dans les MP, et la faible production d'IFN-I par les MP infectés pourrait expliquer la réplication modérée de LASV dans ces cellules. Les MP ont aussi la capacité d'activer d'autres types de cellules immunitaires. Comme expliqué en section 3.2.2, les MP infectés par MOPV ou LASV sont capables d'induire une activation des NK. Cette activation dépendait aussi de la production d'IFN-I par les MP [181].

**Cellules dendritiques** Les DC sont le troisième type de CPA. *In vivo*, les DC des organes lymphoïdes secondaires sont infectées dès 7 jours p.i [82]. Les moDC (monocytes-derived DC), obtenues par différenciation *in vitro* de monocytes, sont aussi permissives à l'infection par LASV et produisent des quantités importantes de particules virales [9]. Comme les MP, l'infection des moDC par LASV n'induit ni apoptose ni activation des cellules. Dans les moDC, MOPV se comportait comme LASV : infection productive, hauts titres viraux, pas (ou très peu) d'activation des cellules [154]. Comme pour les MP, la réplication de LASV dans les moDC était inhibée par l'activation exogène de la réponse IFN-I, mais aucune réponse IFN-I n'était détectée en condition d'infection [11].

Ces études *in vitro* suggèrent que le rôle des DC dans l'induction de la réponse innée

à LASV est limité. Cependant, un autre rôle crucial des DC est leur capacité à induire une réponse adaptative spécifique. Cet aspect a été étudié *ex vivo* grâce à un modèle de coculture de moDC et de LT humains [156]. Dans ce système, les moDC infectées par MOPV produisaient IFN-I, IL-12, CXCL10 et CXCL11. Ce n'était pas le cas pour les moDC infectées par LASV. De plus, les moDC infectées par MOPV étaient capables d'activer les LT CD4 et CD8. Ces LT proliféraient, produisaient des cytokines (IL-2, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) et développaient un phénotype mémoire ou une réponse cytotoxique. Les LT cultivés avec des moDC infectées par LASV s'activaient peu et plus tardivement. Ces résultats suggèrent que les moDC sont capables d'induire une réponse T efficace contre MOPV, mais pas contre LASV. Cette différence pourrait avoir des conséquences importantes *in vivo* sur la réponse globale à LASV.

En résumé, la réponse des CPA à LASV est faible. Ce constat a été fait chez les patients infectés par LASV (Figure 1.16). Cependant, cette absence de réponse innée n'implique pas forcément l'absence de présentation d'Ag et donc d'induction de la réponse adaptative.

### 3.3 Réponse immunitaire adaptative

#### 3.3.1 Réponse humorale

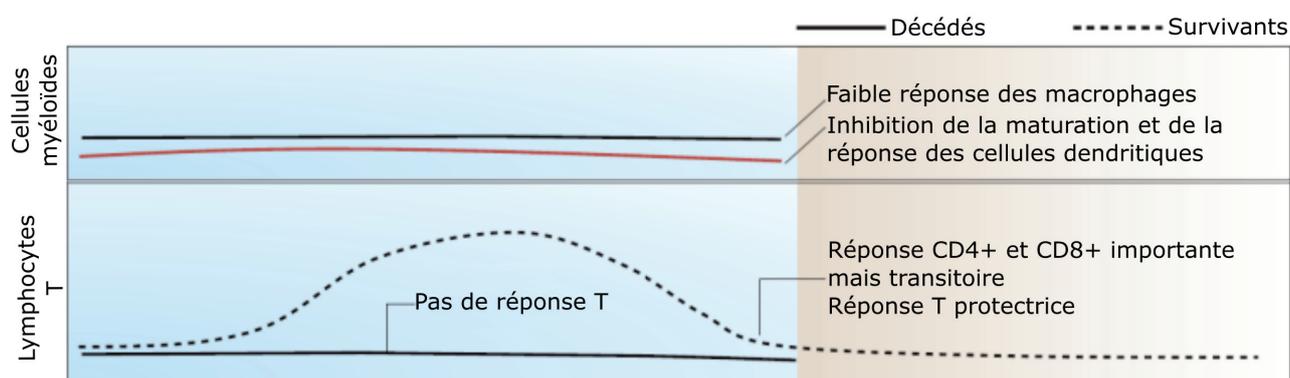
**Production d'anticorps** Les patients infectés par LASV produisent des Ac anti-LASV, ciblant la GP, la NP ou la Z [95]. La réponse à LASV inclut donc une réponse humorale (Figure 1.16). Cependant, cette réponse Ac n'est pas corrélée à l'issue de la maladie. Ce même constat a été fait en laboratoire chez des PNH infectés par LASV [10]. Les tests de vaccins contre LASV suggèrent que la production d'Ac ne suffit pas à induire une immunité protectrice. En effet, les vaccins inactivés induisent, chez le PNH, une réponse Ac importante, mais ne sont pas protecteurs (voir section 1.4.2).

**Anticorps neutralisants** Parmi les Ac produits au cours de LASV, très peu sont neutralisants [10]. La production d'Ac neutralisants au cours de l'infection est un point de divergence entre les Arénavirus de l'ancien monde et du nouveau monde. En effet, il a été montré que l'infection par JUNV induisait des quantités importantes d'Ac neutralisants [55]. De plus, ces Ac semblent importants pour le contrôle dans la maladie, car le transfert de plasma contenant des Ac neutralisant est un traitement efficace contre JUNV. Pour la réponse humorale, l'épitope majoritaire est la GP, et la différence ancien monde/nouveau monde semble liée à cette protéine. La GP de JUNV possède moins de sites de N-glycosylation que celle de LASV [199]. Il a été montré que ces modifications post-traductionnelles étaient un obstacle à l'efficacité de neutralisation des Ac. Ainsi les N-glycosylations de la GP de LASV pourraient former un "bouclier" protégeant le virus des Ac. LASV n'étant pas neutralisé par ces Ac, et la réponse humorale n'est pas efficace.

### 3.3.2 Réponse T

**Données cliniques** La majorité des FHV sont caractérisées par une lymphopénie importante qui touche tous les compartiments lymphocytaires [164]. Dans le cas de LASV, la lymphopénie est transitoire et n'est pas causée par une apoptose des LT. L'activation des LT chez les patients infectés par LASV est précoce et protectrice. Elle semble corrélée à la survie des patients (Figure 1.16) [164]. Chez les survivants de LASF, des réponses T mémoires contre la NP et la GP de LASV ont été détectées jusqu'à 6 ans après l'infection [202]. La réponse T contre LASV semble donc protectrice lors de la maladie mais aussi à long terme.

**Données expérimentales** Les expérimentations menées sur LASV confirment les observations chez l'homme. Les PNH infectés par LASV présentent une lymphopénie transitoire, une diminution de la prolifération des LT et une déplétion des LT dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus [10]. Chez les singes qui ont survécu à l'infection, une activation importante mais transitoire des LT CD8+ et une prolifération des LT CD4+ ont été observées entre 5 et 15 jours p.i [10]. Cette activation des LT n'a pas été détectée chez les animaux qui sont morts de l'infection. *In vitro*, la coculture de moDC et de LT a permis d'étudier la réponse T à LASV (voir section 3.2.3) [156]. Il a été montré avec ce modèle que les moDC infectées par LASV n'induisaient qu'une faible réponse T. En revanche, les moDC infectées avec MOPV étaient capables d'induire une réponse T efficace et spécifique. Cette différence dans l'induction de la réponse T pourrait être liée à la différence de pathogénicité entre ces deux virus.



**FIGURE 1.16: Évènements immunologiques au cours de LASF selon l'issue de la maladie**

Les lignes pleines modélisent le cours de l'infection chez les patients qui décèdent de LASF, les lignes pointillées ceux qui survivent. Les MP et les DC répondent peu ou pas à l'infection par LASV. La réponse T corrèle avec l'issue de la maladie, une forte réponse CD4+ et CD8+ étant associée à la survie. Adapté d'après [164].

**Rôle critique de la réponse T** La différence de réponse T entre MOPV et LASV, ainsi que la corrélation de cette réponse avec la survie de PNH infectés par LASV, suggèrent que la réponse T est cruciale pour le contrôle de l'infection par LASV. Le rôle essentiel de la réponse T chez la souris infectées par LCMV est cohérente avec cette hypothèse [228]. Les essais vaccinaux contre LASV vont aussi dans ce sens : parmi les vaccins testé jusqu'à aujourd'hui, les plus protecteurs sont ceux qui induisent une réponse T importante et spécifique contre LASV (voir section 1.4.2).

En conclusion, une réponse globale efficace contre LASV semble reposer sur deux éléments du système immunitaire : la réponse IFN-I et la réponse T. A l'intersection entre ces deux réponses se trouvent les CPA, capables de produire des IFN-I directement en réponse à un pathogène et nécessaires à l'initiation de la réponse T. Les mécanismes sous-jacents à l'activation ou l'absence d'activation de ces cellules en réponse à LASV sont donc particulièrement intéressants.

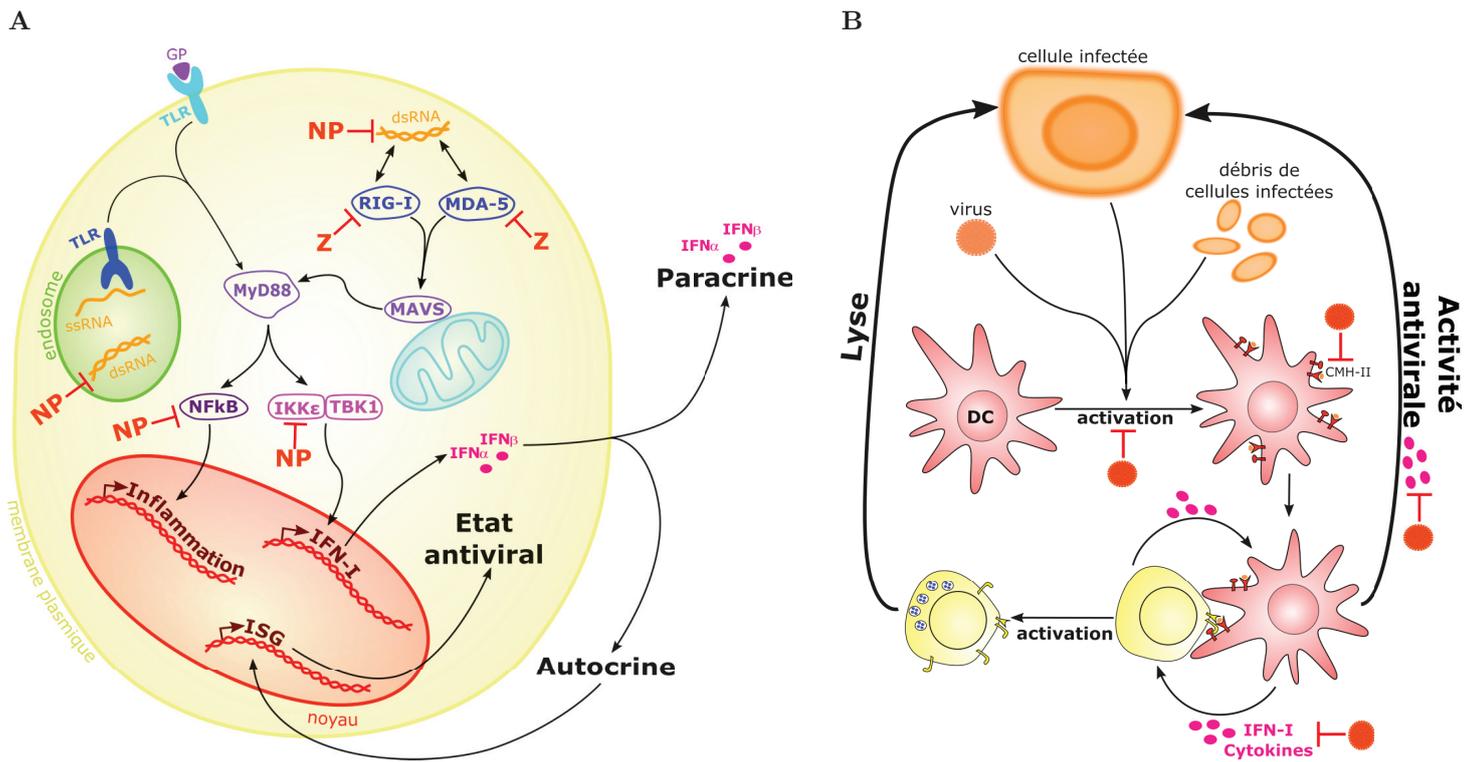
### 3.4 Inhibition de la réponse immunitaire par les Arénavirus

Chez le rongeur, dont différentes espèces constituent les réservoirs de la majorité des Arénavirus, le virus est toléré. Chez l'homme ou le PNH, qui sont des hôtes accidentels, la réponse immunitaire est importante. Comme de nombreux virus, les Arénavirus sont capables de contrecarrer cette réponse. Certaines étapes de la réponse immune, qui sont particulièrement efficaces dans le contrôle de l'infection, sont des cibles potentielles. La protéine immunosuppressive majeure est la NP, mais la Z de certains Arénavirus est aussi capable d'inhiber la réponse immune.

**Rôle de la NP** La NP de LASV, et des Arénavirus en général, peut influencer de deux manières la réponse immunitaire : en évitant la détection de l'infection, ou en inhibant les voies de réponse. Les propriétés de la NP impliquées dans l'évasion de la réponse immune sont portées par son domaine ExN. Il a été montré qu'un virus LASV dont la fonction ExN de la NP a été abolie induisaient une réponse innée importante via RIG-I [174]. Ce domaine ExN et sa capacité d'inhiber la réponse IFN-I sont communs à la grande majorité des Arénavirus. Comme expliqué en section 2.3.2, le domaine ExN digère spécifiquement les ARNdb [35]. Des ARNdb sont produits durant la réplication virale et peuvent être détectés par les senseurs cellulaires, en particulier les RLR (RIG-I-like Receptors) RIG-I et MDA-5. La détection d'ARNdb par les RLR induit une cascade de signalisation et une réponse antivirale (Figure 1.17A). La digestion des ARNdb par le domaine ExN de la NP permet d'échapper à la détection par les RLR et donc l'induction d'une réponse antivirale. La NP peut aussi inhiber activement la production IFN-I. La NP de LCMV interagit avec la kinase IKK $\epsilon$  et bloque sa capacité à phosphoryler IRF3 [166]. IRF3 non phosphorylé n'est pas transloqué vers le noyau et la production d'IFN-I est bloquée. Il semble aussi que la NP soit capable de bloquer la voie NK $\kappa$ B, mais le mécanisme est encore inconnu [138].

**Rôle de la Z** Si le rôle de la NP dans l'immunosuppression par les Arénavirus est bien établi, les résultats sur la Z sont moins clairs. La Z des Arénavirus du nouveau monde est capable d'interagir avec le domaine CARD des RLR, inhibant leur activation (voir section 2.3.3) [56]. Pour les autres Arénavirus, les résultats des différentes études sur l'interaction entre les RLR et la Z sont contradictoires [56, 223].

**Inhibition des DC** Comme décrit précédemment, les CPA, dont les DC, semblent situées à l'intersection des voies immunitaires efficaces contre LASV. LASV étant majoritairement associée à une immunosuppression, il est probable que les DC soient les cibles des propriétés immunosuppressives de LASV (Figure 1.17B). L'évasion de la réponse immune induite par la NP peut éviter la détection de l'infection par les DC. Les mécanismes d'immunosuppression peuvent éviter, suite à la détection du virus ou de cellules infectées, l'activation des DC, la présentation des Ag viraux et la production de cytokines et d'IFN-I. Sans activation des DC, il n'y aura ni réponse IFN-I antivirale ni initiation de la réponse T. Ainsi les deux types de réponses les plus efficaces contre LASV peuvent être inhibés par l'intermédiaire des DC.



**FIGURE 1.17: Inhibition de la réponse immunitaire par les Arénavirus**

**A)** Voies d'activation de la réponse inflammatoire et de la réponse IFN-I au sein des cellules infectées par les Arénavirus. Les protéines virales peuvent agir à différentes étapes afin d'éviter et/ou de supprimer cette réponse.

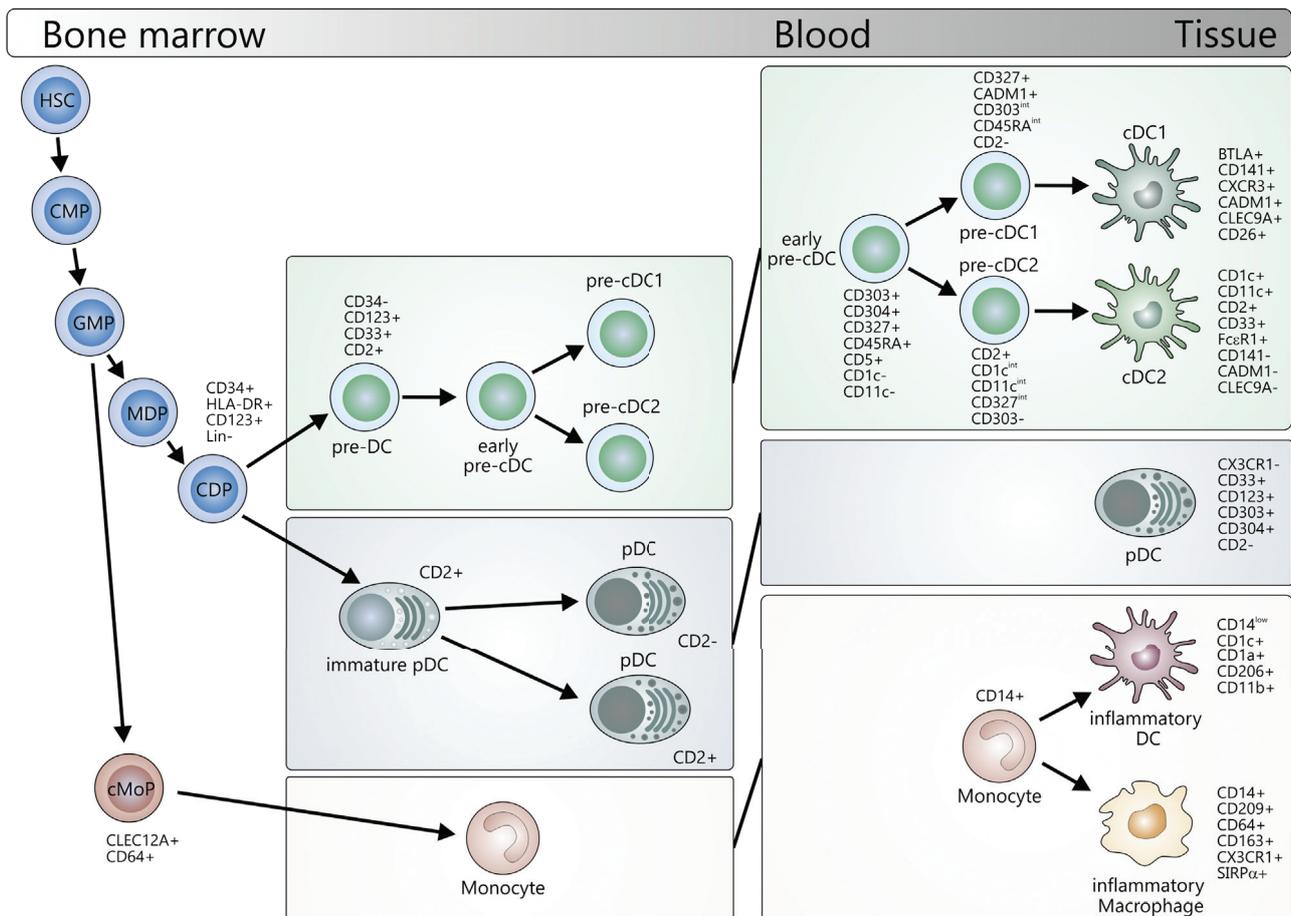
**B)** Mise en place de la réponse globale contre les Arénavirus. Si les mécanismes sont moins connus, les virus peuvent agir à différentes étapes afin d'éviter et/ou de supprimer cette réponse. Inspiré de [180, 138]

## 4 Cellules dendritiques

### 4.1 Caractéristiques des DC

Les DC ont un rôle central dans la réponse immunitaire des vertébrés. Elles sont capables d'induire et de moduler de nombreux types de réponses contre des pathogènes variés. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse sont localisées dans le sang, dans les épithéliums et dans les organes lymphoïdes secondaires. C'est une catégorie très hétérogène composée de différentes sous-populations, chacune ayant des fonctions plus ou moins exclusives.

**Historique** Les premières DC décrites sont les cellules de Langerhans (DCL), identifiées dans la peau en 1868 [12]. La caractérisation complète des DC n'a débuté qu'à partir des années 1970. Elles étaient alors considérées comme des cellules accessoires, et c'est seulement après purification que leur fonction de CPA a pu être révélée. Les DC sont donc décrites comme des cellules exprimant des CMH et capables de présenter des



**FIGURE 1.18: Voies de différenciation des cellules dendritiques**

Modèle actuel développé à partir d'analyses de transcriptomique, de spectrométrie en flux (CyTOF), de cytométrie en flux à haut débit et d'études fonctionnelles [188].

Ag aux LT [200]. Au fur et à mesure, les études ont révélé le rôle central des DC dans la réponse immunitaire des vertébrés, tant au niveau de la mise en place d'une réponse que de la tolérisation. Les DC sont capables d'induire et de moduler de nombreux types de réponses contre de nombreux pathogènes. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse peuvent être localisées dans le sang, dans les épithéliums et dans les organes lymphoïdes secondaires. Phénotypiquement parlant, les DC sont définies par l'expression d'HLA-DR et l'absence d'autres molécules de lignage (CD3, CD19/20, CD56). Mais c'est une catégorie très hétérogène composée de différentes sous-populations, chacune ayant ses spécificités. Les études successives ont permis l'identification de ces catégories, la reclassification des populations identifiées, et l'analyse de leurs fonctions.

**Différenciation** Dans la moelle osseuse, les cellules souches (HSC, cellules souches hématopoïétiques) se différencient en progéniteurs qui se différencient en sous-types spécialisés [188]. A l'origine, le modèle de différenciation des DC consistait en une séquence précise de progéniteurs bien distincts identifiables grâce à des marqueurs spécifiques (Figure 1.18). Les différentes population divergent à différentes étapes : d'abord la lignée monocyttaire, qui peut donner des DC dites inflammatoires, ensuite la lignée pDC, et enfin les mDC1 et mDC2.

Des analyses récentes de transcriptomique sur cellule unique ont cependant montré que la différenciation était plutôt continue avec une forte hétérogénéité tout au long du processus [160]. Ces techniques suggèrent aussi que le devenir des précurseurs est déterminé très tôt dans le processus de différenciation [189].

**Classification** Les populations et sous-populations majeures de DC, ainsi que les marqueurs les caractérisant et les organes où elles se trouvent, sont décrits dans la table 1.4. Les premières DC décrites sont les DCL. Les DCL sont situées dans les épithéliums de la peau et des divers muqueuses. La microglie est parfois considérée comme un type particulier de DCL localisé dans le cerveau. DCL et microglie sont des populations cellulaires capables de s'auto-renouveler. Les DCL, mais pas la microglie, sont capables de se différencier en DC migratoires, que l'on retrouve dans le cortex des ganglions lymphatiques (DC interpénétrantes langerin+ CD1a<sup>high</sup>) [42]. Les DCL expriment le CMH-I, et les molécules de capture et de présentation d'Ag sont localisées dans des endosomes spécifiques, les granules de Birbeck. Les fonctions des DCL ont été difficiles à identifier. Aujourd'hui, on pense qu'elles jouent un rôle dans la tolérance de la flore commensale, mais conservent la capacité à répondre à des pathogènes dans un contexte inflammatoire.

Les DC majoritaires et les plus étudiées sont les DC myéloïdes (mDC). Elles expriment les antigènes myéloïdes classiques CD11c, CD13 et CD33. Elles correspondent chez la souris aux DC conventionnelles CD11b+. Les mDC comportent deux sous-population majoritaires : BDCA1 (ou CD1c ou mDC2) et BDCA3 (ou CD141 ou mDC1) [52]. Les mDC CD1c sont majoritaires, constituent 1% des PBMC. Les mDC CD1c du sang sont majoritairement immatures, celles dans les tissus sont plus acti-

vée (sur-expression de CD40, CD80, CD83 et CD86). On trouve de nombreuses mDC CD1c dans les ganglions lymphatiques au contact de cellules T. Elles expriment tout l'appareillage de détection des pathogènes et de présentation d'Ag. Les mDC CD141 sont plus rares (10% des mDC). Elles sont appelées DC "cross-presenting". Par rapport aux mDC CD1c, elles assimilent plus efficacement les débris cellulaires [7].

Si la majorité des DC *in vivo* proviennent de précurseurs différents des monocytes, ces derniers sont capables de se différencier en DC. *In vivo*, des environnement inflammatoires divers (psoriasis, dermatite, ...) induisent la différenciation de monocytes en DC inflammatoires. *In vitro*, l'ajout de GM-CSF et d'IL-4 permet de différencier des monocytes en moDC [179]. Parmi les propriétés des moDC on trouve la stimulation des LT CD4, la cross-présentation à des LT CD8 et la production de cytokines (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12, IL-23). On trouve *in vivo* d'autres DC dites "monocyte-like", les DC CD14+. Elles sont très peu nombreuses, se trouvent dans les tissus non lymphoïdes et expriment HLA-DR, DC-SIGN et CD11c, mais pas les marqueurs CD1c ou CD141. Ces DC semblent impliquées dans la tolérisation. Globalement, les fonctions des DC "monocyte-like" sont encore mal comprises.

Les DC plasmacytoïdes (pDC) sont la dernière population majeure de DC. Elles possèdent des capacités sécrétoires importantes et une morphologie semblable au plasmocytes, ce qui leur a valu ce nom. Elles sont caractérisées par l'absence de marqueurs

Population		Marqueurs		Localisation		
		Homme	Souris	Sang	Organes lymphoïdes	Tissus
mDC	majeures	CD1c Dectin1 Dectin2	CD11b CD4 ESAM	+	+	+
	cross-presenting	CD141 CLEC9A XCR1	CD103 CD8 CLEC9A XCR1 Langerin	+	+	+
pDC		CD303 CD304 CD123	B220 Siglec H	+	+	
mo-like	CD14+	CD14 CD209 Factor XIIA	CD11b CD64 CXCR1 CD14		+	+
	inflammatoires	CD1c (CD16-)	CD209 CD206			+
Langerhans		Langerin CD1a	Langerin CD11b			épithélium

TABLE 1.4: Différentes catégories de cellules dendritiques. Adapté d'après [42, 41, 196]

myéloïdes et l'expression de CD123, CD303 et CD304 [42]. On trouve des pDC dans le sang (majoritairement immatures) et dans les ganglions lymphatiques, mais très peu dans les tissus quiescents. Cependant, en cas d'inflammation, elles sont rapidement recrutées dans les organes périphériques. Les pDC sont peu efficaces dans la présentation d'Ag et l'activation des LT, mais sont capables de produire des quantités importantes d'IFN-I [14]. La majorité des IFN-I produits lors d'une infection aiguë proviennent des pDC. Ces dernières années, l'importance des pDC dans la réponse antivirale n'a pas cessée de croître.

## 4.2 Cellules dendritiques myéloïdes

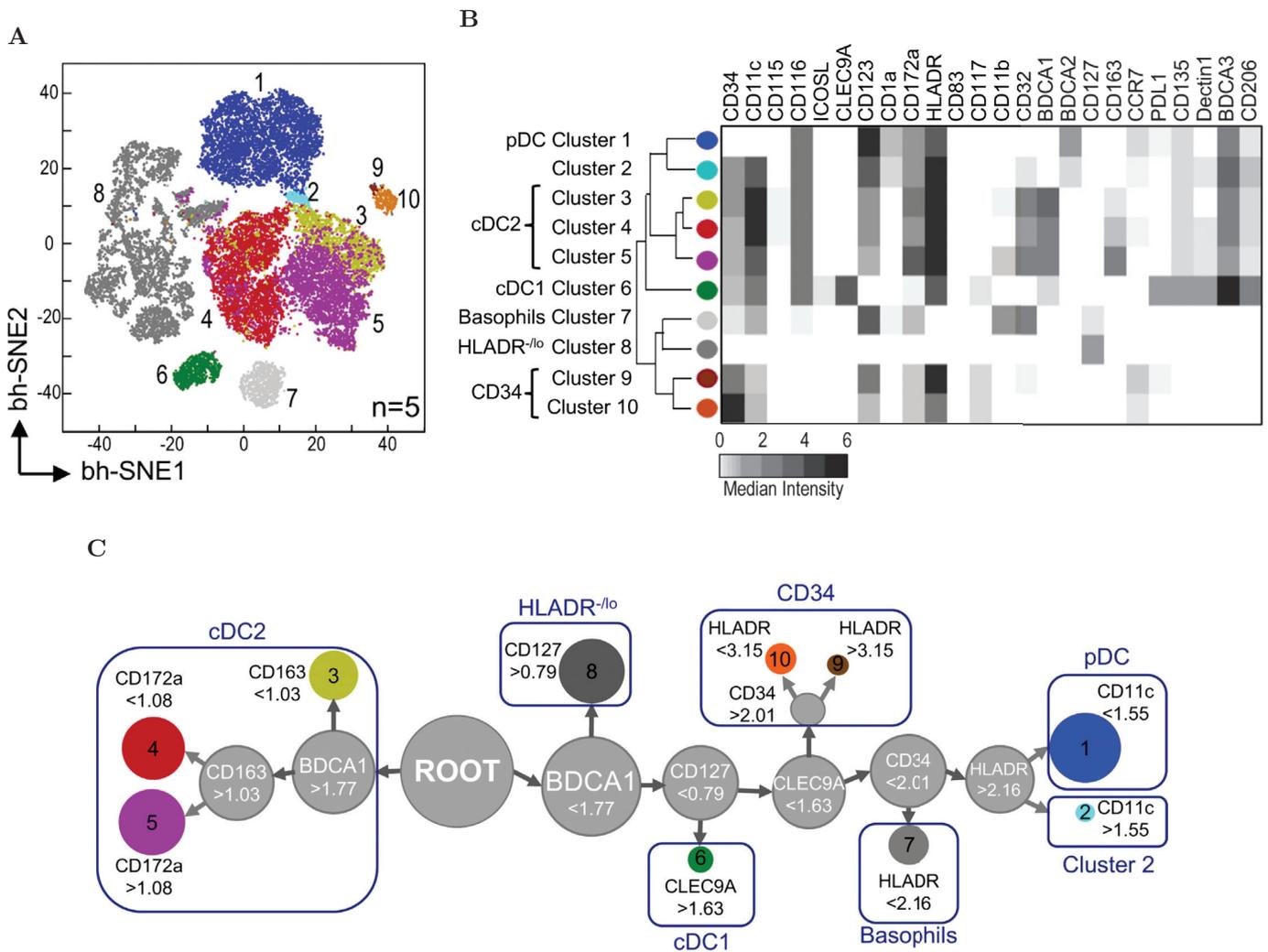
**Caractéristiques des mDC** Souvent, la description des DC et de leur fonction correspond en fait aux caractéristiques des mDC. Les mDC sont donc très étudiées, en particulier la présentation des Ag et l'activation de la réponse T. Cependant, elles sont aussi capables de produire des cytokines et des IFN-I en réponse à un pathogène. Même si elles ne produisent pas des quantités aussi importantes d'IFN-I que les pDC, comme elles sont beaucoup plus nombreuses, l'IFN-I produit par les mDC peut avoir un rôle crucial *in vivo* [5]. Chez les souris infectées par LCMV, les IFN-I produits par les mDC sont essentiels à l'initiation de la réponse T [83].

Une étude récente utilisant la spectrométrie en flux a quantifié un nombre important de marqueurs sur les DC du sang, de la peau, de la rate et des amygdales de donneurs sains humains [1]. Leurs résultats sont illustrés en figure 1.19. Grâce à une analyse en composante principale de tous ces marqueurs, des clusters de DC (Figure 1.19A) et leurs marqueurs caractéristiques (Figure 1.19B) ont été identifiés. Certains de ces clusters correspondent aux populations de DC précédemment décrites. On y retrouve les deux sous-populations de mDC : CD141 (cDC1, cluster 6) et CD1c (cDC2, clusters 3, 4 et 5). Les mDC CD141 sont peu nombreuses et homogènes. Les mDC CD1c sont plus nombreuses et composées de 3 clusters définis par les marqueurs CD163 et CD172a (Figure 1.19C). Ces mêmes populations, avec des effectifs variables, ont été isolées dans la peau, la rate et les amygdales. Une hypothèse est que les mDC CD141 seraient plus efficaces pour répondre aux parasites intracellulaires, et les mDC CD1c plus efficaces pour répondre aux parasites extracellulaires [74].

**mDC et Arénavirus** Les études sur la réponse des mDC se divisent en 3 catégories : *in vivo* (souvent chez la souris), modèle moDC ou mDC primaires (très rarement). Dans le cas de la réponse aux Arénavirus, de nombreuses études rongeurs se sont intéressées à la réponse des mDC à LCMV. Elles ont montré entre autre que l'initiation d'une réponse T CD8 dépendait uniquement des DC, et pas des MP ou des lymphocytes B [84]. Les travaux sur la réponse des mDC à LASV sont moins nombreux et ont tous été réalisés avec le modèle moDC. Leurs résultats ont été détaillés en section 3.2.3. Brièvement, les moDC sont permissives à l'infection par LASV et MOPV [9, 154]. Les

moDC s'activent peu lors de l'infection par MOPV et pas du tout lors de l'infection par LASV. Seules les moDC infectées par MOPV peuvent activer les LT [156].

**Modèle moDC** Comme évoqué plus haut, les moDC appartiennent à la catégorie des DC inflammatoires. Cependant, à cause de leur efficacité dans la présentation d'Ag et l'activation des LT, elles sont largement utilisées comme modèle des mDC. La majorité des études de la réponse des mDC dans le contexte d'une infection virale ont été menées sur des moDC. Mais l'étude de caractérisation des DC humaines citée précédemment [1] remet en question la validité des moDC comme modèle des mDC. En



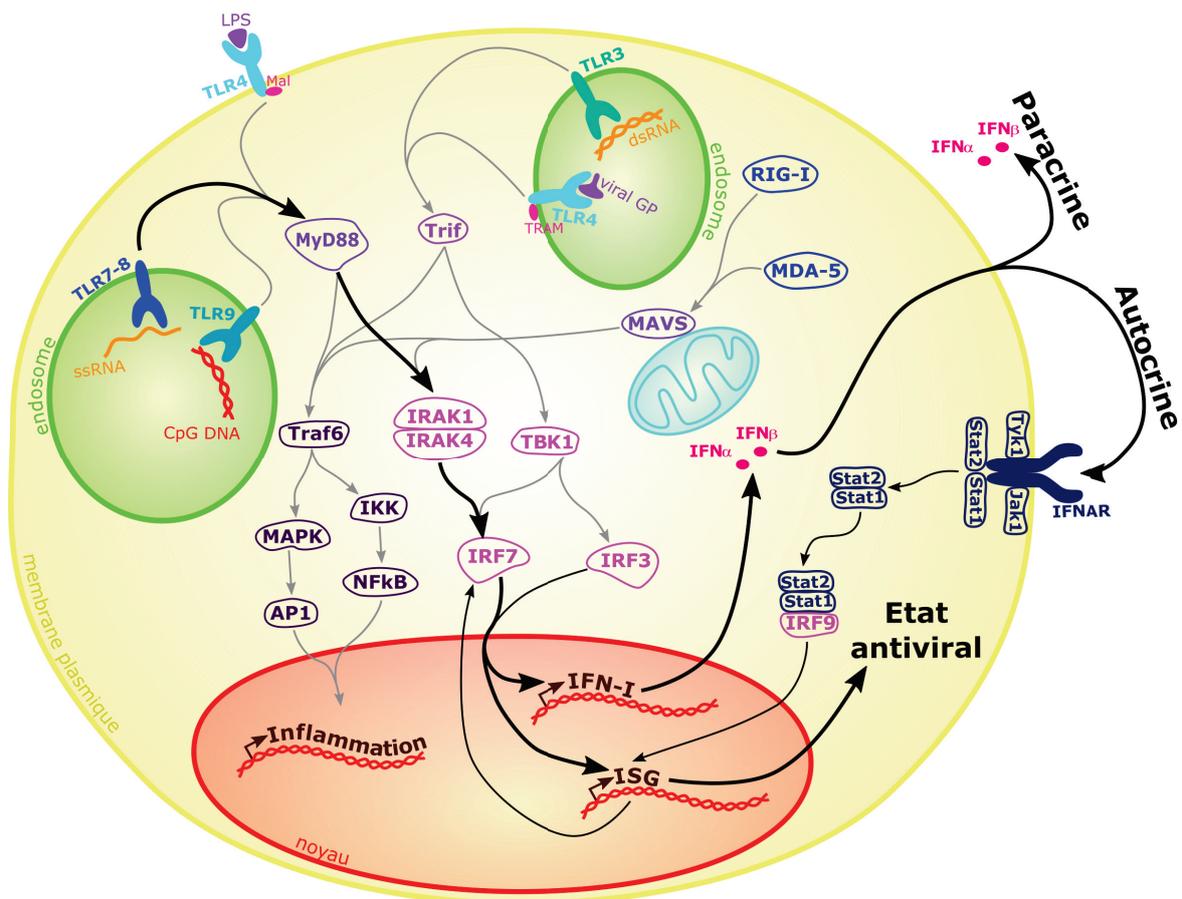
**FIGURE 1.19: Phénotypage des populations de DC humaines** Les cellules cDC, DC conventionnelles, correspondent aux mDC.

**A)** Clusterisation des DC humaines suite à l'analyse en composante principale des données de CyTOF. Les cellules CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> contaminantes ont été exclues avant l'analyse. Les populations 1 à 10 ont été colorées artificiellement. **B)** Intensité d'expression des marqueurs définissant les clusters 1 à 10. **C)** Arbre de ségrégation des populations de DC identifiées selon les marqueurs exprimés. Issu de [1].

effet, dans ce modèle de phénotypage, les moDC ne clusterisent avec aucune population de DC identifiée *in vivo*. Les moDC ne correspondent donc à aucune population de DC présente chez des individus sains. De plus, il a été montré que moDC et mDC primaires avaient des susceptibilités différentes à l'infection par le virus Influenza [8]. Ce modèle est donc à utiliser avec précaution. Tous les modèles ayant des défauts, on ne peut pas rejeter en bloc tous les résultats ayant été obtenus avec des moDC. Il est par contre essentiel de vérifier, dans le contexte de l'infection par LASV, si ce modèle est pertinent ou pas.

### 4.3 Cellules dendritiques plasmacytoïdes

**Production d'IFN-I** Au moment de leur découverte, les pDC ont été nommées cellules productrices d'IFN-I. Plus tard, des tests de différenciation des progéniteurs de DC (CDP) ayant permis d'obtenir des pDC, elles ont été classifiées en tant que DC. Certains spécialistes de la différenciation des DC questionnent aujourd'hui cette classification : ils pensent que les pDC obtenues par différenciation de CDP provien-



**FIGURE 1.20: Voies de production d'IFN-I par les pDC en réponse à un pathogène** Les voies de signalisation RLR et TLR sont indiquées. Les flèches en gras indique les voies les plus activées chez les pDC.

draient en fait d'autres progéniteurs contaminants. Cette hypothèse, supportée par les différences importantes entre les pDC et les autres DC, n'est pour l'instant ni démontrée ni largement acceptée.

Chaque pDC peut produire jusqu'à 10 pg d'IFN-I, soit 10 à 100 fois plus que tous les autres types cellulaires [14]. Les pDC sont spécialement efficaces lors des infections virales grâce à l'expression importante de TLR7 et TLR9. Les voies d'activation des pDC diffèrent selon le type de pathogène (viral ou bactérien). Ces différences semblent liées à la reconnaissance par les TLR dans des compartiments endosomaux différents [131]. L'interaction des TLR avec leurs ligands induit une cascade de signalisation via MyD88, IRF et NF $\kappa$ B (Figure 1.20). L'activation des RLR induit aussi les voies NK $\kappa$ B et IFN-I, via MAVS. Les conséquences de cette activation sont la production de molécules inflammatoires et d'IFN-I. Les IFN-I produits agissent de manière autocrine et paracrine sur les cellules, induisant l'expression des IGS (Interferon Stimulated Genes, gènes stimulés par l'IFN) et un état antiviral. Chez les pDC, la voie majeure d'activation est TLR7/9, MyD88, IRF7, IFN-I. IRF7, qui est normalement un ISG, est exprimé constitutivement par les pDC, ce qui explique en partie leur efficacité en tant que cellules productrices d'IFN [14].

**pDC et infections virales** Les mécanismes de réponse des pDC à une large variété de virus ont été étudiés. Des pDC primaires humaines ont été mises en contact avec des cellules infectées par HCV [50]. L'activation des pDC dans ce contexte était médiée par l'export d'exosomes contenant des ARN viraux par les cellules infectées. Lors de l'infection par YFV, l'activation des pDC en présence de particules virales était RIG-I-dépendante [26]. En revanche, l'activation des pDC au contact de cellules infectées par YFV était dépendante de TLR7. Ainsi différents stimuli induisaient la production d'IFN-I par des voies différentes. Pour le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), les virions seuls étaient de faibles stimulateurs des pDC [108]. En revanche, des lymphocytes infectés par le HIV induisaient une forte réponse IFN-I par des pDC primaires humaines, via des senseurs endosomaux (TLR7) et cytoplasmiques (RLR).

Les données sur la réponse des pDC aux Arénavirus sont limitées à l'infection par LCMV. Différents types de souris KO ont montré que la réponse T anti-LCMV dépendait de MyD88, et que les pDC étaient une source importante d'IFN-I lors de l'infection par le LCMV [96]. Certaines souches de LCMV ne sont pas détectées par TLR7 et n'induisent pas la production d'IFN-I par les pDC, ce qui suggère une détection de LCMV via TLR7 et MyD88 [14]. Alors que les pDC ne sont pas susceptibles à l'infection par de très nombreux virus, il semblerait que LCMV infecte les pDC [121]. LCMV se fixe même plus facilement sur les pDC que sur les mDC, probablement car les pDC expriment plus d' $\alpha$ DG que les mDC. *In vivo*, les pDC infectées et non-infectées produisent des IFN-I. Des travaux plus récents suggèrent que les pDC ne peuvent être infectées par des particules de LCMV, mais peuvent s'infecter au contact de cellules infectées [91]. La réponse des pDC à LASV n'a encore jamais été étudiée.

## 5 Problématique : intérêt de l'étude des pDC et mDC lors de l'infection par LASV

**LASV, un problème de santé publique** La circulation de LASV en Afrique de l'ouest a un coût humain, social et économique important pour les pays touchés [148]. La distribution géographique du réservoir rongeur de LASV et les spécificités hôte/virus limitent sa dispersion, mais les risques en dehors de la zone d'endémie ne sont pas nuls. En effet, LASV est la FHV la plus exportée, en partie à cause de sa longue période d'incubation et de la méconnaissance de cette maladie [68]. Le reste du monde n'est donc pas à l'abri de cas importés et de la transmission inter-humaine de LASV. Comme les traitements contre LASV sont limités, en disponibilité et en efficacité, LASV est une menace pour la santé publique au niveau mondial. L'OMS a souligné cette menace en classant LASV parmi les pathogènes émergents les plus susceptibles de causer de graves crises sanitaires dans un futur proche, et pour lesquels nous disposons de peu de moyens d'action [215].

Le développement de nouvelles prophylaxies et thérapies est limité par le manque de connaissance sur LASV. En particulier, les mécanismes de pathogenèse de LASV et les facteurs (viraux et immunologiques) déterminant sa sévérité sont encore mal décrits. Or, la compréhension des déterminants menant à la mort ou à la survie des patients infectés par LASV est essentielle pour améliorer leur prise en charge, faciliter le diagnostic, concevoir des vaccins efficaces et inspirer de nouvelles pistes thérapeutiques. La recherche fondamentale sur LASV est donc une étape indispensable pour le développement des outils nécessaires au contrôle de LASV.

**Facteur immunologiques critiques** Une des questions les plus problématiques est le rôle joué par le système immunitaire durant LASV. La réponse immunitaire à LASV est une condition *sine qua non* à la survie de l'hôte. Cependant, les dommages tissulaires observés durant LASV, et à l'origine de certains symptômes, ne peuvent pas être expliqués entièrement par la réplication du virus. Il est largement accepté que la pathogenèse de LASV a une composante immunitaire. La réponse immune a donc un rôle ambivalent durant l'infection par LASV : précoce, spécifique et contrôlée, elle peut stopper l'infection ; tardive, généralisée et dérégulée, elle peut aggraver les symptômes. Il est intéressant d'identifier les acteurs du système immunitaire qui sont bénéfiques pour l'hôte, et ceux qui sont délétères. On saurait alors quels mécanismes de réponse favoriser, ou inhiber, lors de la conception de nouveaux vaccins ou traitements. Les études précédentes ont montré l'importance de la réponse IFN-I et de la réponse T dans la réponse globale à LASV. *In vivo*, il existe une corrélation entre la survie des PNH infectés et un pic précoce d'IFN-I [10]. La circulation de LT activés a aussi été observée uniquement chez les PNH survivants. La comparaison *in vitro* de LASV avec MOPV, virus proche mais non pathogène, va aussi dans ce sens. L'infection par MOPV induit une forte réponse IFN-I chez les MP, et l'activation des LT par les DC [154, 156].

Lors de l'infection par LASV, ces réponses sont faibles et plus tardives. Ainsi la réponse IFN-I et la réponse T semblent impliquées dans une réponse efficace à LASV. Comprendre comment ces deux réponses sont induites permettrait d'avoir une vision globale des mécanismes sous-jacents.

**DC et LASV** Le constat de l'importance de la réponse IFN-I et de la réponse T nous a poussé à nous intéresser aux DC. En effet, les DC sont impliquées dans la réponse antivirale innée (dont la production d'IFN-I) mais aussi dans l'initiation de la réponse T [42]. D'après les modèles de pathogenèse de LASV, les DC semblent être les premières cibles de LASV lors de l'infection d'un nouvel hôte (voir section 1.3). Deux résultats sont possibles : une réponse rapide et efficace qui stopperait l'infection, ou une infection productive qui permettrait la dissémination systémique du virus. Dès les toutes premières étapes de l'infection, les DC peuvent déjà avoir un rôle bénéfique ou délétère.

Nous avons d'abord choisi d'étudier la réponse des pDC à LASV. Ces cellules sont spécialisées dans la production d'IFN-I en réponse à un pathogène, et pourraient être cruciales dans la réponse à LASV [14]. La production d'IFN-I par les pDC stimule un état antiviral chez tous les types cellulaires, bloquant ainsi la dissémination du virus (Figure 1.21).

Nous nous sommes aussi intéressés à la réponse de mDC à LASV. Ces cellules peuvent produire des IFN-I en réponse au virus, mais moins efficacement que les pDC. Cependant, comme les mDC sont plus nombreuses que les pDC *in vivo*, ces IFN-I peuvent être importants. Les mDC sont surtout spécialisées dans la présentation d'Ag et l'induction de la réponse T. Après avoir rencontré le virus, elles peuvent présenter des Ag viraux aux LT et initier leur activation (Figure 1.21). Les IFN-I jouent un rôle de cofacteur dans la stimulation des LT. Les LT peuvent ensuite spécifiquement éliminer les cellules infectées, et stopper l'infection.

pDC et mDC pourraient donc jouer un rôle essentiel dans la réponse IFN-I et la réponse T lors de l'infection par LASV. Et la combinaison de ces deux réponses semble essentielle pour le contrôle de l'infection, l'élimination du virus et la survie des patients.

**Dans ce manuscrit** Les travaux présentés ici visent à identifier les caractéristiques de la réponse des pDC et des mDC à LASV. Nous avons utilisé des pDC et mDC humaines primaires, isolées à partir du sang périphérique, et donc majoritairement immatures. Pour évaluer l'importance potentielle de la réponse de ces cellules dans la forte pathogénicité de LASV, nous avons utilisé le modèle de comparaison LASV/MOPV. Nous avons étudié en parallèle la réponse des pDC et mDC à LASV et à MOPV. Les différences de réponse entre ces deux virus pourraient être des facteurs impliqués dans la forte pathogénicité de LASV. Nous avons tout d'abord étudié l'infection des pDC et mDC par MOPV et LASV. Une infection productive de ces cellules, en plus de moduler leur capacité à répondre efficacement, pourrait être impliquée dans la dissémination

de LASV. Ensuite nous nous sommes intéressés à la réponse des pDC et des mDC à MOPV et LASV. Nous avons quantifié la réponse IFN-I, des cytokines/chémokines

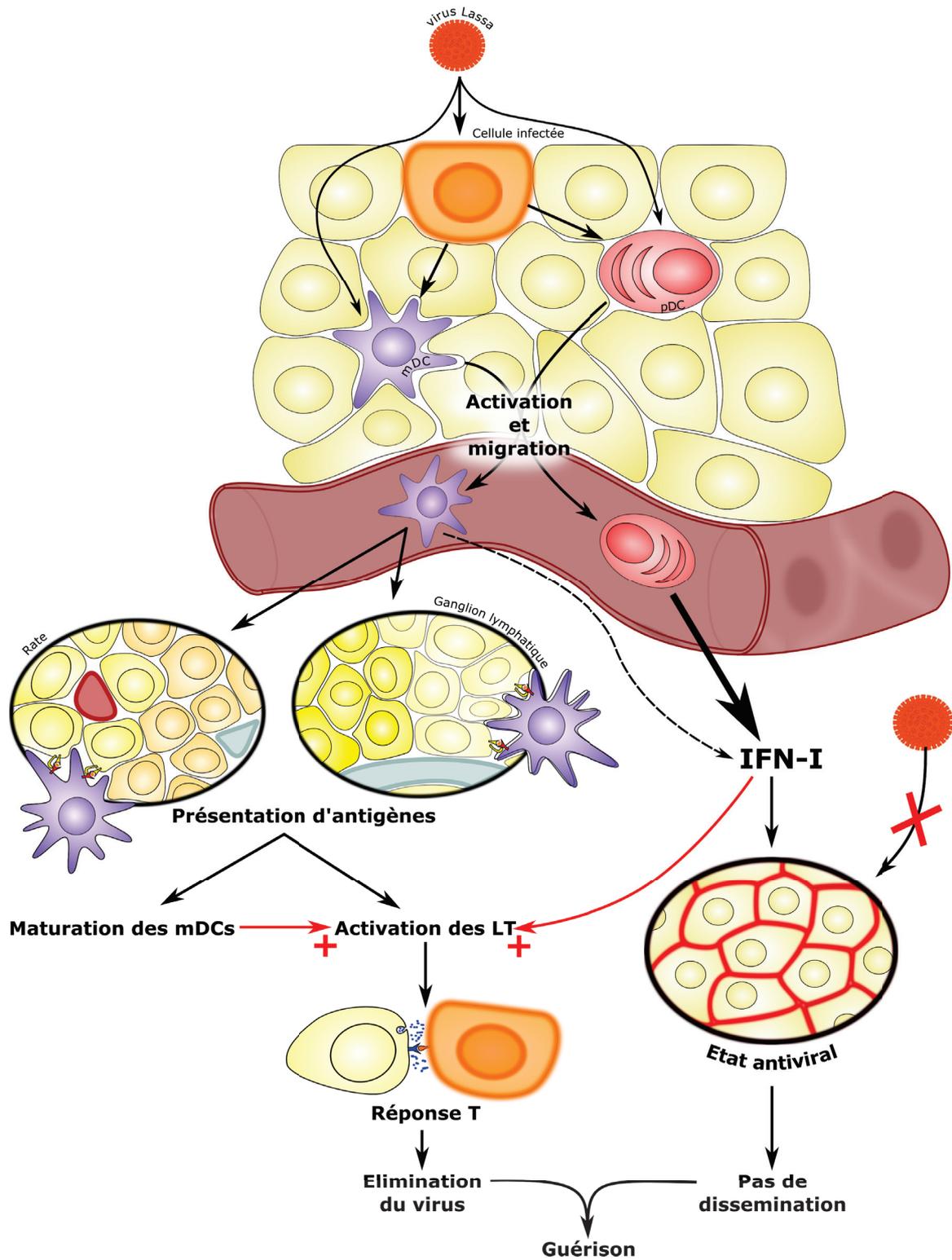


FIGURE 1.21: Schéma présentant l'intérêt de l'étude des mDC et pDC dans le contexte de l'infection par LASV

classiques et l'activation des cellules. Afin d'avoir une image plus complète, nous avons utilisé des techniques à large spectre (luminex, transcriptome). Ces techniques permettent d'avoir une vision globale des modulation de l'état des cellules par MOPV et LASV. Pour les mDC, nous avons mis en place un modèle de coculture avec des LT. Ce modèle nous a permis d'évaluer la capacité des mDC infectées par MOPV ou LASV à induire une réponse T. Enfin, pour essayer de comprendre quels sont les déterminants viraux des différences observées entre MOPV et LASV, nous avons utilisé des virus chimériques. Ces virus sont composés d'une charpente MOPV ou LASV, dans laquelle un ORF a été remplacé par l'ORF correspondant de LASV ou MOPV respectivement. En répétant les expériences réalisées précédemment avec ces virus, nous avons pu déterminer le rôle de chaque protéine virale dans les différences observées. Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur la réponse des DC à LASV. Il donnent une image large de l'activation des pDC et mDC à LASV. De plus, la comparaison avec MOPV est un indicateur de l'importance des différents mécanismes d'activation dans la pathogénicité de LASV. Nous avons aussi pu faire le lien entre l'activation des mDC et l'induction de la réponse T. Enfin, les chimères MOPV/LASV sont un outil intéressant pour évaluer le rôle des différents composants viraux. Les différences de réponse des pDC et des mDC entre MOPV et LASV suggèrent que la réponse de ces cellules peut être critique pour lutter contre LASV. Ces travaux peuvent nous aider à comprendre les déterminants très précoces de la pathogénicité de LASV.

## 1 Réponse antivirale innée : infection des cellules dendritiques plasmacytoïdes par LASV

Tous les résultats présentés ici ont été obtenus avec des cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines primaires. Ces pDC ont été purifiées à partir de poches de sang prélevées le jour même et fournies par l'EFS. Les cellules ont été conservées sur la nuit avant infection.

### 1.1 Infection des pDC par MOPV et LASV

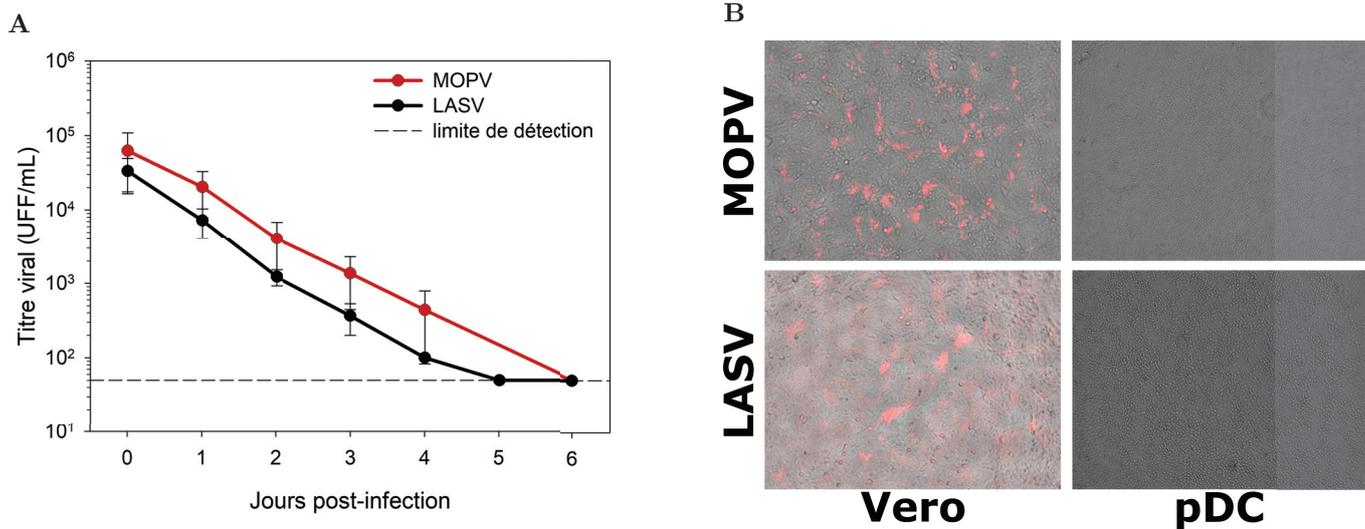
Les travaux sur de nombreux virus ont montré que les pDC n'étaient pas permissives à l'infection [108, 48, 50]. Cependant, LCMV se réplique dans des pDC murines *in vivo* [121]. L'infection des pDC par LASV n'a jamais été testée, mais les pDC expriment des quantités importantes d' $\alpha$ DG, ainsi que LAMP1, les récepteurs de LASV [121]. L'entrée de LASV dans les pDC est donc en théorie possible.

#### 1.1.1 Infection par des particules infectieuses

**Production de particules virales** Des pDC ont été infectées par MOPV ou LASV (MOI=0,1). De 0 à 6 jours p.i, le surnageant a été prélevé. Les particules virales présentes dans ces surnageants ont été titrées, et les résultats sont présentés en figure 2.1A. On observe une diminution progressive des titres infectieux de MOPV et de LASV. Cette diminution du titre viral, d'environ un facteur 5 chaque jour, correspond à celle observée pour une suspension virale placée à 37 ° C. Ainsi, les pDC ne sont pas infectées de manière productive par MOPV et LASV. Elles n'éliminent pas non plus activement le virus

**Virus fluorescent** Nous avons développé des virus fluorescents exprimant la mCherry : MOPV-mCh et LASV-mCh. Ces virus, obtenus par génétique inverse, codent pour la NP et la mCherry à partir d'un même ORF. Les séquences codantes de la NP et de la mCherry sont séparées par un site de clivage ribosomal P2A. Pendant la traduction, le polypeptide est clivé au niveau du site P2A et donne deux protéines fonctionnelles.

Des pDC (et des veroE6 comme contrôle) ont été infectées par MOPV-mCh et LASV-mCh et observées par microscopie. Les images sont présentées en figure 2.1B. Un



**FIGURE 2.1: L'infection des pDC par MOPV et LASV n'est pas productive**  
**A)** Des pDC ont été infectées par MOPV ou LASV à MOI=0,1. De 0 à 6 jours p.i, le surnageant a été prélevé et titré. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 3 expériences indépendantes. **B)** Des pDC ou des veroE6 ont été infectées par MOPV-mCh ou LASV-mCh à MOI=0,1. Des photos en phase et en fluorescence rouge (mCherry) ont été prises à 2 jours p.i.

signal rouge est observé pour les veroE6, indiquant l'expression des protéines virales. Aucune fluorescence n'est détectée pour les pDC. L'infection des pDC par MOPV et LASV est donc contrôlée en amont de la phase de synthèse des protéines virales.

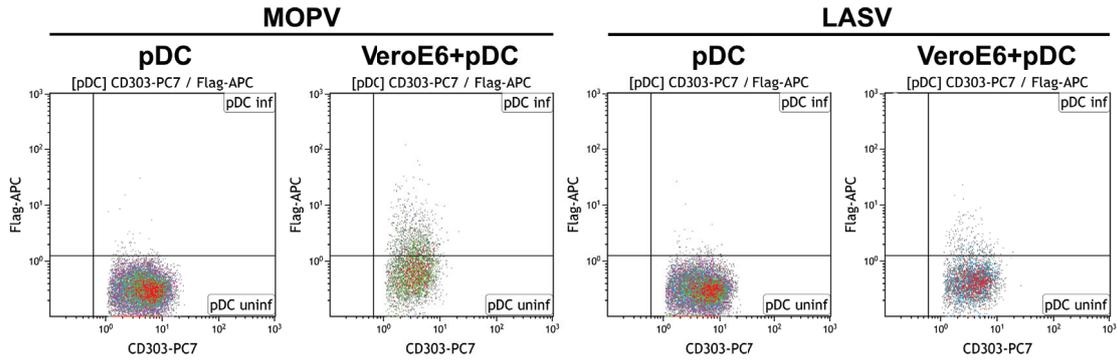
**Nous avons donc montré que l'infection de pDC primaires par MOPV et LASV n'était pas productive. Pour les deux virus, le cycle est stoppé en amont de la production des protéines virales.**

### 1.1.2 Infection au contact de cellules infectées

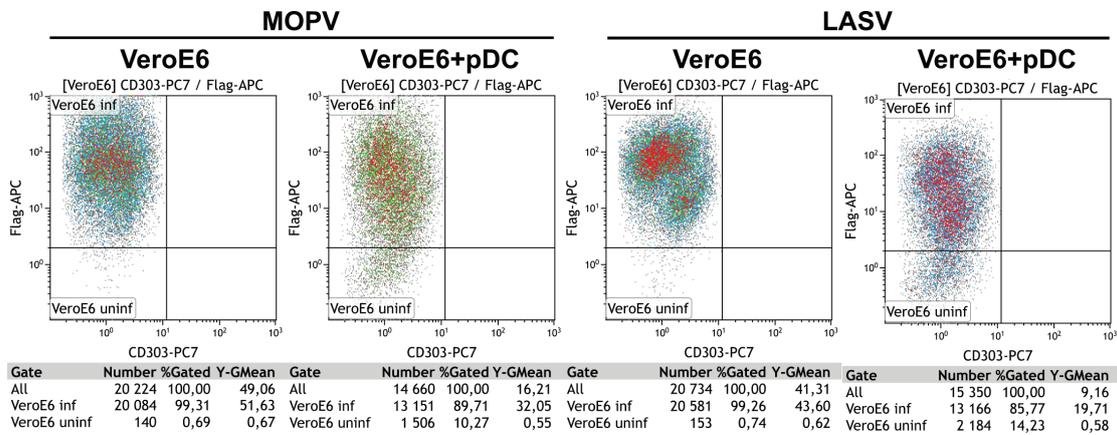
De travaux récents ont montré que des cellules CAL-1, une lignée de pDC, n'étaient pas infectables par LCMV *in vitro* [91]. Cependant, au contact de cellules infectées par LCMV, ces cellules étaient permissives. Les mêmes résultats ont été obtenus avec un LCMV pseudotypé, dont la GP a été remplacée par celle de LASV. Nous avons testé si le contact avec des cellules infectées par LASV ou MOPV était suffisant pour rendre les pDC primaires permissives.

Pour ces tests, nous avons utilisé des virus dont la protéine Z comportait un tag en N-ter (MOPV<sub>Zflag</sub> et LASV<sub>Zflag</sub>). Ces virus ne sont pas ou très peu atténués par rapport aux virus sauvages. Des cellules veroE6 ont été infectées avec MOPV<sub>Zflag</sub> et LASV<sub>Zflag</sub> (MOI=0,3). Après 24h, des pDC ont été mises en cultures avec ces veroE6 infectées. 24h post-coculture (soit 48h p.i), les cellules ont été récoltées et leur infection a été analysée par cytométrie en flux (condition vero+pDC). Comme contrôle, nous avons utilisé des veroE6 infectées (MOI=0,3) et analysées à 48h p.i (condition vero)

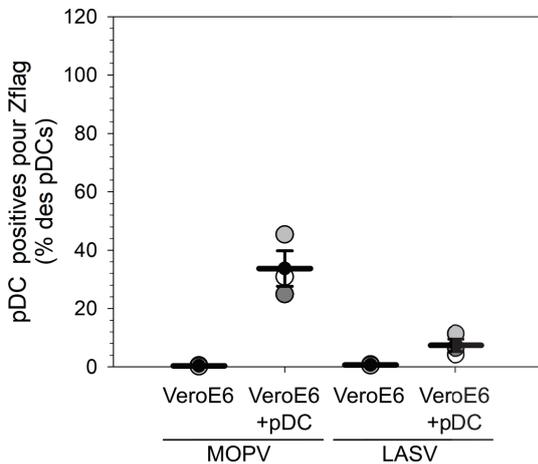
A



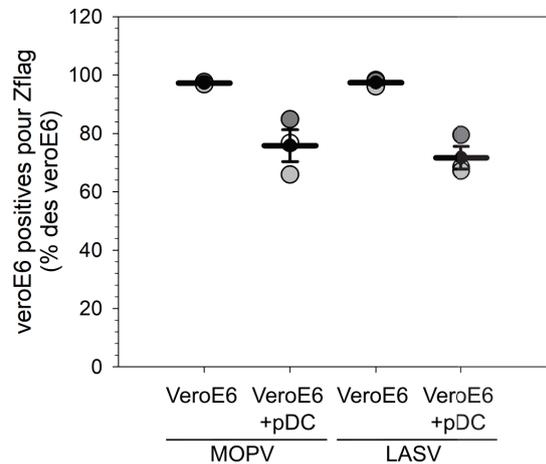
B



C



D



**FIGURE 2.2: MOPV et LASV sont détectés dans les pDC au contact de cellules infectées**

Des pDC ont été infectées par MOPV<sub>Zflag</sub> ou LASV<sub>Zflag</sub> (MOI=0,1) ou mises en culture avec des veroE6 infectées (MOI=0,3). Les cellules infectées ont été quantifiées par cytométrie en flux 24h p.i. **A-B)** Graphes de cytométrie illustrant la proportion de pDC (A) ou de veroE6 (B) positives pour la Z. **C-D)** Quantification des pDC (C) ou veroE6 (D) positives pour la Z de MOPV ou LASV. Les points représentent 3 expériences indépendantes, les barres la moyenne et l'ES.

et des pDC infectées (MOI=0,1) et analysée à 24h p.i. La quantification des veroE6 et des pDC infectées est présentée en figure 2.1.

**Infection des pDC** Les pDC ont été identifiées par cytométrie en flux grâce à un marquage Lin1-/HLA-DR+/CD303+. Dans la condition pDC, très peu de cellules sont positives pour le marquage viral (marquage Flag, Figure 2.2A et 2.2C). Nous avons donc bien une absence de permissivité des pDC à l'infection par MOPV<sub>Zflag</sub> et LASV<sub>Zflag</sub>. En revanche, en coculture avec des veroE6 infectées, on observe des pDC positives pour la Z. Ces cellules sont plus nombreuses avec MOPV qu'avec LASV. Le protocole utilisé ne permet pas de discriminer entre les particules virales internalisées par les pDC et les virions néoformés. Les pDC positives pour la Z sont donc soit des pDC ayant phagocyté un grand nombre de particules virales, soit des pDC infectées. Cependant, l'intensité du marquage de la Z dans les pDC infectées est faible par rapport aux veroE6, qui sont productivement infectées. Cette observation suggère que les Z détectées en intracellulaire dans les pDC proviennent plutôt de particules virales internalisées.

**Contrôle de l'infection des vero** Dans ces cocultures veroE6/pDC, nous avons aussi quantifié les veroE6 infectées (Figure 2.2B et 2.2D). Les veroE6 infectées par MOPV<sub>Zflag</sub> ou LASV<sub>Zflag</sub> sont positives pour le Flag à plus de 95%. En coculture avec des pDC, la proportion de cellules infectées diminue à 70% pour MOPV<sub>Zflag</sub> et LASV<sub>Zflag</sub>. Les pDC sont donc capables de contrôler l'infection par MOPV, mais aussi par LASV.

**Les virions de MOPV et LASV n'infectent pas les pDC. Les pDC ne semblent pas non plus accumuler de virions. En revanche, au contact de cellules infectées par MOPV ou LASV, la Z de MOPV ou LASV est détectable dans les pDC. Ces Z peuvent provenir soit de l'infection productive des pDC, soit d'une augmentation des capacités phagocytiques des pDC. La quantité de pDC positives est supérieure avec MOPV par rapport à LASV. De plus, en coculture, les pDC peuvent contrôler partiellement l'infection des veroE6 par MOPV et LASV, dans une proportion similaire pour les deux virus.**

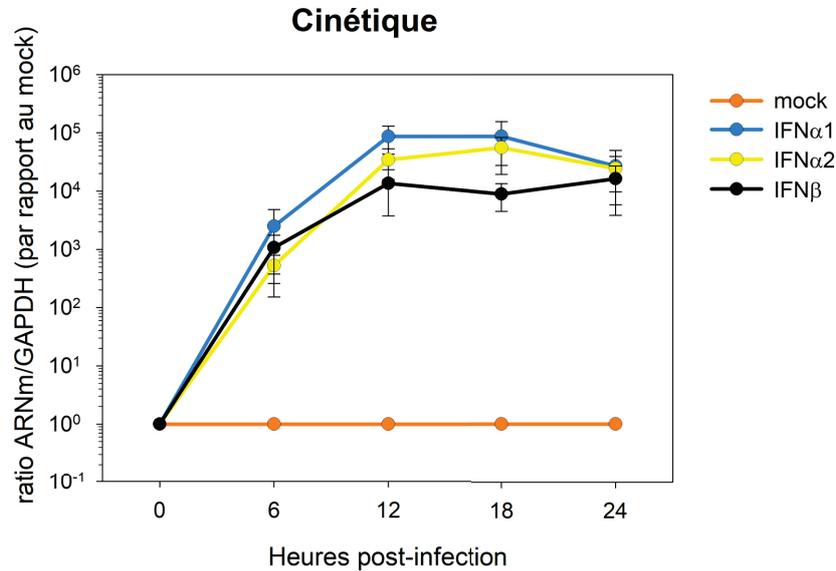
## 1.2 Réponse IFN-I des pDC à MOPV et LASV

La caractéristique majeure des pDC est leur capacité à produire rapidement des quantités importantes d'IFN-I en réponse à un pathogène. Nous avons donc évalué la réponse IFN-I des pDC purifiées à MOPV et à LASV.

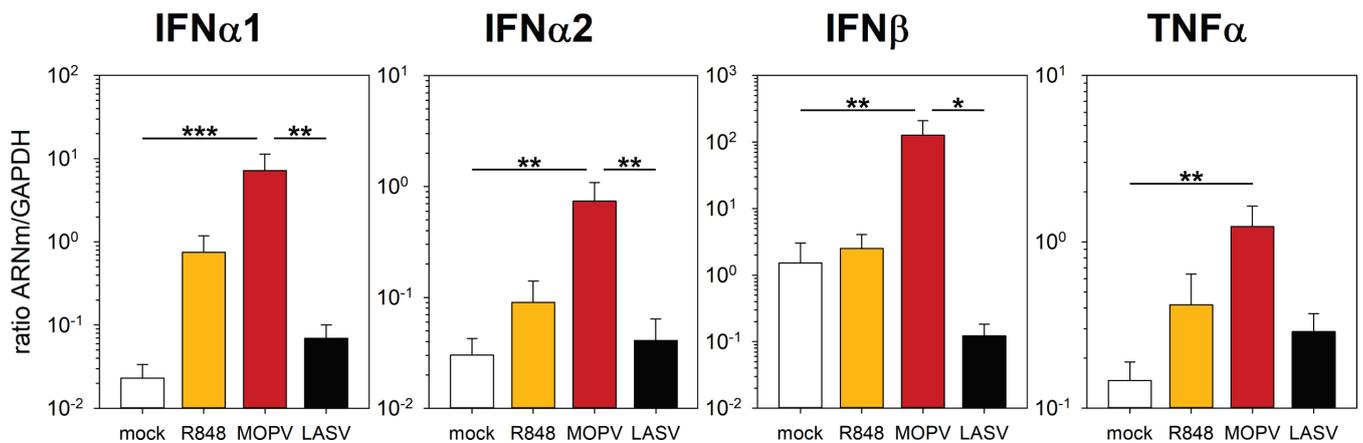
**Cinétique de réponse à MOPV** Afin de déterminer le délai optimal après l'infection pour la suite des études, nous avons quantifié la réponse IFN-I des pDC à MOPV

au cours du temps. Des pDC infectées par MOPV (MOI=2) ou non infectées (mock) ont été récoltées toutes les 6h entre 0 et 24h p.i. Les ARNm des IFN-I ont été quantifiés par RT-qPCR. La figure 2.3A présente la différence d'expression des IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2

A



B



**FIGURE 2.3: Réponse IFN-I des pDC à MOPV et LASV**

**A)** Des pDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock) ou MOPV (MOI=2). Toutes les 6 h p.i, les ARNm des IFN-I ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les résultats présentés correspondent à l'expression différentielle des gènes entre les pDC infectées par MOPV et les pDC non-infectées. Les courbes représentent la moyenne et l'ES pour 3 expériences indépendantes. **B)** Des pDC ont été cultivées pendant 16h avec du milieu de culture (mock), du R848 (1  $\mu$ g/mL), MOPV ou LASV (MOI=2). Les ARNm des IFN-I et du TNF $\alpha$  ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 8 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*),  $P_{value} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{value} < 0,001$  (\*\*\*)

et IFN $\beta$  entre les pDC infectées par MOPV et celles non infectées. L'infection des pDC par MOPV induit une sur-expression importante des ARNm des IFN-I. Cette augmentation est détectable dès 6h p.i, augmente jusqu'à 12h p.i puis se stabilise et diminue. Nous avons donc décidé d'étudier la réponse IFN-I des pDC à MOPV et LASV à 16h p.i.

**Réponse à MOPV et LASV à 16h p.i** Nous avons ensuite quantifié la réponse des pDC à LASV (en comparaison avec MOPV) à 16h p.i. Le R848, ligand de TLR7 et TLR8, est utilisé comme contrôle positif d'activation. Les résultats sont présentés dans la figure 2.3. Comme obtenu en cinétique, l'infection des pDC par MOPV induit une sur-expression importante des IFN-I, et une faible sur-expression du TNF $\alpha$ . En revanche, les pDC infectées par LASV ont des niveaux d'IFN-I et de TNF $\alpha$  comparables aux pDC non infectées. Les pDC ne semblent donc pas produire d'IFN-I en réponse à LASV.

**Les pDC primaires purifiées produisent des quantités importantes d'IFN-I en réponse à MOPV. L'infection par LASV n'induit par contre pas de réponse IFN-I par les pDC.**

### 1.3 Activation des pDC par MOPV et LASV

Nous avons ensuite voulu étudier plus largement la réponse des pDC à MOPV et à LASV, en quantifiant différents types de marqueurs d'activation : marqueurs membranaires par cytométrie en flux, molécules sécrétées par Luminex, et expression des gènes par analyse transcriptomique.

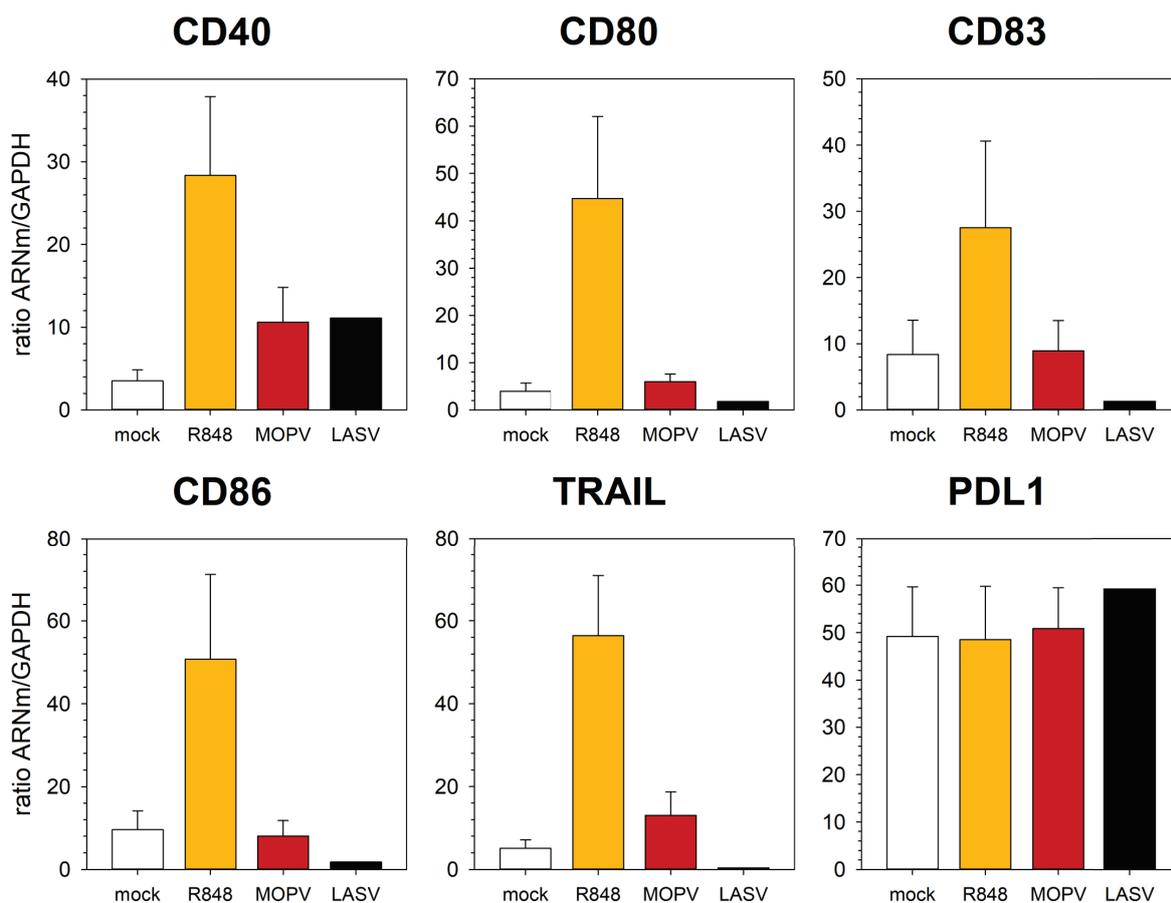
#### 1.3.1 Marqueurs membranaires

L'activation des pDC est associée à la sur-expression de certaines molécules membranaires. Nous avons infecté des pDC avec MOPV et LASV puis quantifié certains de ces marqueurs par cytométrie en flux (Figure 2.4). Le traitement par le R848 induit une activation des pDC caractérisée par l'expression de CD40, CD80, CD83, CD86 et TRAIL. L'infection par MOPV ou LASV n'induit pas de sur-expression de ces marqueurs. Ces deux virus ne permettent donc pas d'induire l'acquisition d'un phénotype activé par les pDC.

#### 1.3.2 Molécules sécrétées

Des pDC ont été infectées par MOPV ou LASV (MOI=2). Après 16h, 50 cytokines et chémokines ont été dosées dans le milieu de culture par Luminex (Figure 2.5).

La quantification des molécules d'IFN $\alpha$ 2, d'IFN $\beta$  et de TNF $\alpha$  dans le surnageant de culture donne des résultats différents de ceux obtenus par RT-qPCR : nous avons observé une sur-expression des ARNm des IFN-I chez les pDC infectées par MOPV,

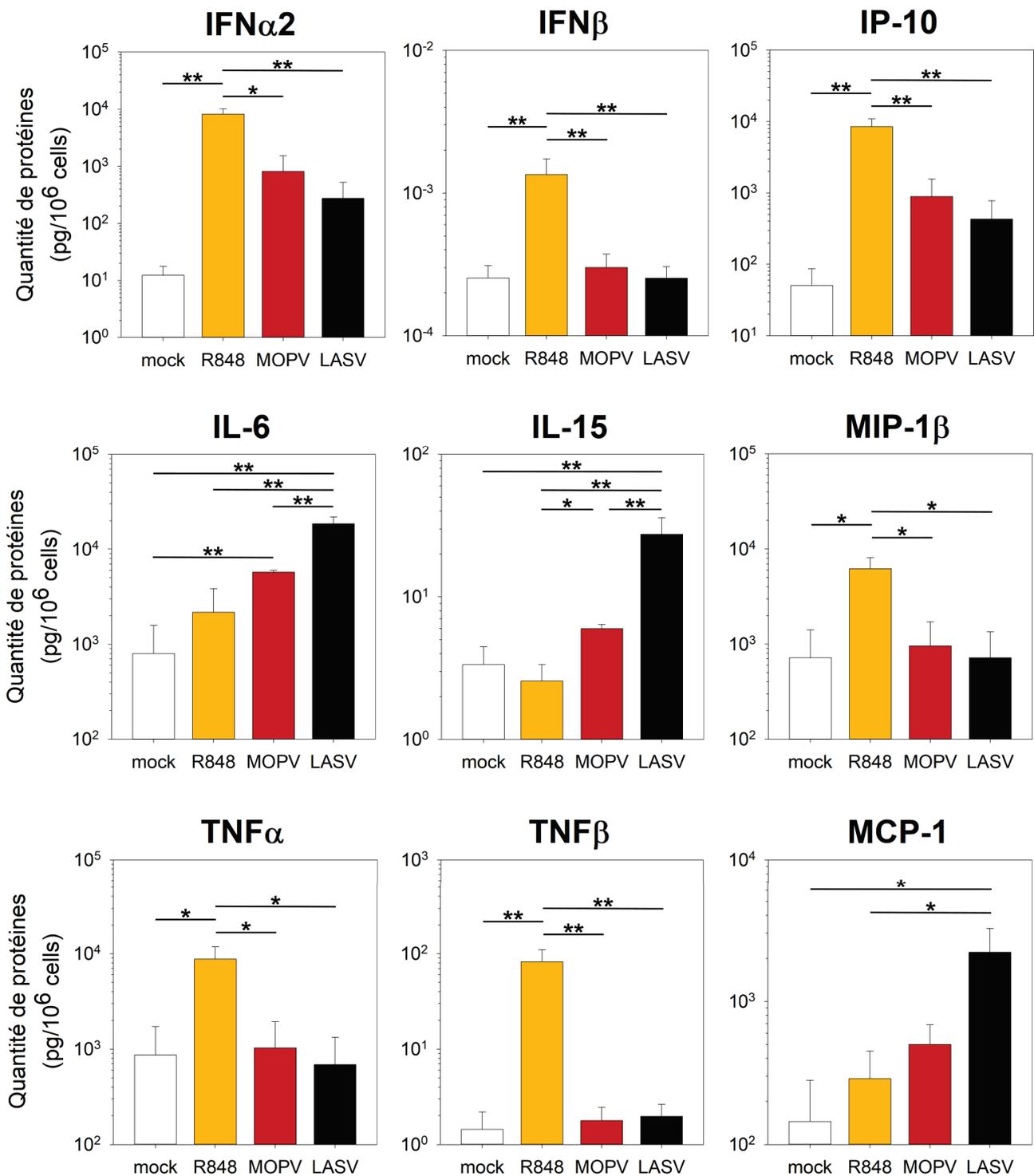


**FIGURE 2.4: Régulation des marqueurs d'activation des pDC en réponse à MOPV et LASV**

Des pDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), du R848 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MOPV ou LASV (MOI=2). L'expression de molécules d'activation à la surface des pDC a été quantifiée par cytométrie en flux. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 6 expériences indépendantes (mock, R848, MOPV) ou une seule expérience (LASV).

mais pas chez celles infectées par LASV (Figure 2.3). Par luminex, l'infection par MOPV ou LASV n'induit pas d'augmentation détectable du niveau d' $\text{IFN}\beta$  ou de  $\text{TNF}\alpha$ . Les pDC infectées par MOPV, mais aussi celles infectées par LASV, produisent de l' $\text{IFN}\alpha 2$ . Les niveaux observés avec LASV semblent être moins importants qu'avec MOPV, mais les différences ne sont pas significatives. Ces différences ARN/protéines peuvent avoir plusieurs origines, dont des différences de cinétique de production, de dynamique dégradation/accumulation, ou de prise en charge par les cellules.

La production d' $\text{IFN}\beta$ , d'IP-10, de MIP-1 $\beta$ , de  $\text{TNF}\alpha$  et de  $\text{TNF}\beta$  par les pDC est induite par le traitement au R848. L'infection par MOPV ou LASV n'impacte pas significativement la production ces cytokines. Ces résultats suggèrent que ni MOPV ni LASV n'induisent une activation complète des pDC *in vitro*. Ces observations ne sont pas forcément valables *in vivo*, ou les stimuli activateurs sont plus nombreux et plus complexes.



**FIGURE 2.5: Cytokines produites par les pDC en réponse à MOPV et LASV**  
 Des pDC ont été cultivées pendant 16h avec du milieu de culture (mock), du R848 (1  $\mu$ g/mL), MOPV ou LASV (MOI=2). Les cytokines présentes dans le milieu de culture ont été quantifiées par Luminex. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 5 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*),  $P_{value} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{value} < 0,001$  (\*\*\*) .

Des résultats intéressants ont été obtenus pour l'IL-6, l'IL-15 et MCP-1. En effet, ces cytokines sont produites en plus grande quantité par les pDC infectées par LASV, comparées aux pDC infectées par MOPV. Or ces molécules ont déjà été identifiées dans des cas humains de FHV. L'IL-6 a été associée aux cas sévères de FHV [23, 10, 206]. La production d'IL-15 et de MCP-1 a aussi été associée aux cas les plus sévères de fièvre hémorragiques de Crimée-Congo (CCHF) [157]. Ces molécules pro-inflammatoires pourraient donc être associées avec les phases tardives de LASV et avoir un impact délétère pour l'hôte. Le rôle potentiel des pDC dans la sécrétion de ces cytokines est à déterminer.

### 1.3.3 État transcriptionnel

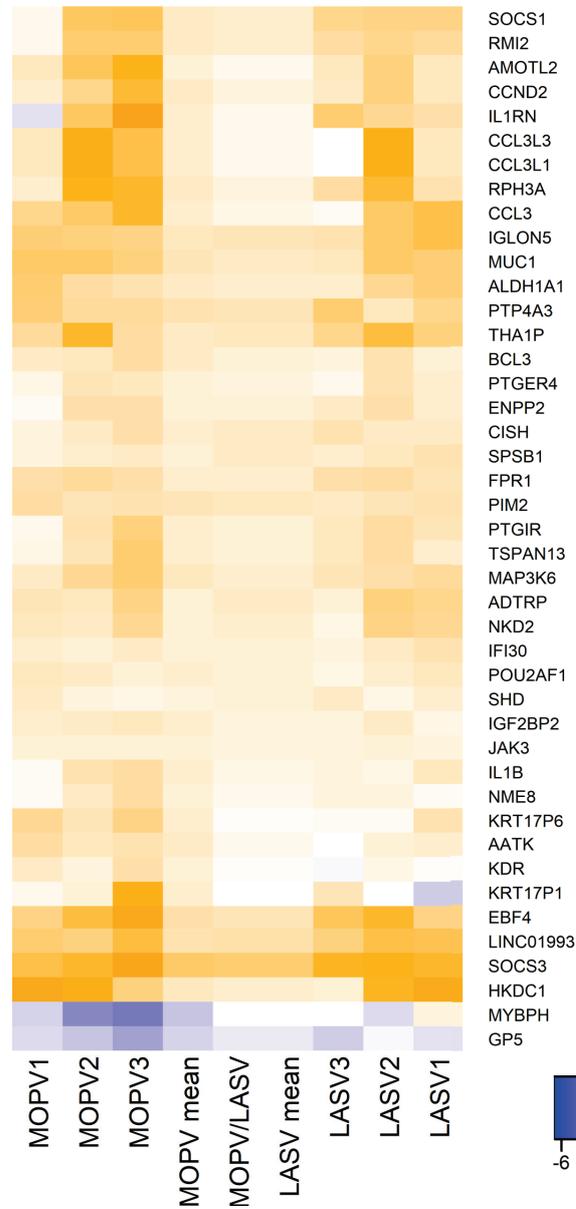
Les ARNm de pDC infectées par MOPV ou LASV ont été quantifiés par séquençage nouvelle génération. Le comptage des fragments correspondant à chaque gène est un indicateur de l'expression de ces gènes. Nous avons obtenu par cette technique l'ensemble des gènes différentiellement exprimés entre nos différentes conditions (mock, MOPV et LASV). Par rapport aux autres techniques, ces résultats donnent une image non biaisée des modifications de l'état cellulaire des pDC au cours de l'infection par MOPV et LASV.

**Gènes régulés** Les gènes dont la différence d'expression entre deux conditions (mock, MOPV et LASV) est statistiquement significative sont illustrés par la figure 2.6. Majoritairement, ces gènes sont impliqués dans des mécanismes immunitaires. La plupart de ces gènes sont sur-exprimés dans les pDC infectées par MOPV mais aussi dans les pDC infectées par LASV. Cependant, la sur-expression induite par MOPV est plus importante que celle induite par LASV. Les familles les plus représentées sont la voie JAK/STAT (SOCS1, SOCS3, ASB2, CISH, JAK3, SPSB1, BCL3), la voie IL1 $\beta$  (IL1B, IL1R1, IL1R, MEFV), les CCL3 (CCL3, CCL3L1, CCL3L3) et les prostaglandines (PTGER4, PTGIR).

Les gènes de la voie JAK/STAT identifiés dans cette étude sont majoritairement des inhibiteurs de la voie. Ces gènes sont plus fortement sur-exprimés par les pDC au contact de MOPV par rapport à LASV. En particulier, l'expression de SOCS3 est multipliée par 6 000 lors de l'infection par MOPV, et seulement par 12 lors de l'infection par LASV. Les gènes SOCS sont impliqués dans les boucles de rétro-contrôle négatif de la voie JAK/STAT [172]. Ce sont des ISG, et ils permettent de rétablir l'homéostasie cellulaire suite à une stimulation et moduler l'activation des cellules. Ainsi, la sur-expression de ces gènes est probablement la conséquence d'une activation antérieure des pDC par MOPV. Ces données ayant été obtenue 12h p.i, elles soulignent la rapidité de la réponse des pDC par MOPV.

Les gènes liés à l'IL1 $\beta$  ou à CCL3 sont sur-exprimés par MOPV, mais pas par LASV. IL-1 $\beta$  est un médiateur essentiel de la réponse inflammatoire [44]. CCL3 (ou MIP-1 $\alpha$ ) a été associé à la réponse des pDC à HIV [106]. Les prostaglandines, en par-

ticulier PGE2, sont impliquées entre autre dans la communication entre les cellules immunitaires. Chez la souris, il a été montré que l'interaction de PGE2 avec sont ré-



**FIGURE 2.6: Régulation des gènes des pDC lors de l'infection par MOPV et LASV**

Des pDC ont été cultivées pendant 12h avec du milieu de culture (mock), MOPV ou LASV (MOI=1). Les ARNm cellulaires de 3 expériences indépendantes ont été quantifiés par amplification poly-A et séquençage nouvelle génération. La colonne centrale (MOPV/LASV) correspond à l'expression différentielle des gènes des pDC infectées par MOPV par rapport à celles infectées par LASV. Les autres colonnes correspondent à l'expression différentielle des gènes des pDC infectées par MOPV ou LASV par rapport à celles non-infectées, pour chaque réplicat (1 à 3) ou en moyenne (mean). Les gènes présentés avaient des différences d'expression statistiquement significatives pour une des comparaisons ( $P_{value}$  ajustée < 0,05).

cepteur EP4 (codé par le gène PTGER4) amplifie la réponse CD40-dépendante des DC [120]. Les récepteurs aux prostaglandines PTGER4 et PTGIR sont sur-exprimé uniquement lors de l'infection par MOPV, et sont un autre marqueur de l'activation globale des pDC par MOPV. Ainsi, l'activation des pDC par MOPV n'affecte pas seulement la réponse IFN-I, mais aussi d'autres voies impliquées dans la réponse immune.

Certains gènes individuels ont attiré notre attention. FRP1 et POU2AF1 sont des régulateurs de l'inflammation. Ces gènes sont sur-exprimés par les pDC infectées par MOPV et LASV, mais l'amplitude de la sur-expression est plus importante avec MOPV. FRP1 est impliqué dans la chimio-attraction des DC et la réponse des cellules phagocytiques aux micro-organismes [38]. Dans des cellules épithéliales de poumon, l'expression de POU2AF1 suite à une stimulation lentivirale induit l'expression de MX1, IFIT3, IFITM, HLA-DRA, et IL6 [227]. FRP1 et POU2AF1 pourraient donc être impliqués dans la régulation globale de l'activation des pDC par MOPV. Enfin, VPRESB3 est sous-exprimé dans les pDC infectées par MOPV comparé aux pDC infectées par LASV. À l'origine, VPRESB3 a été identifié chez les lymphocytes B et est impliqué dans la maturation ou l'assemblage du pré-BCR [127]. Récemment, il a été montré que la capacité des pDC à répondre via TLR9 était inhibée par l'interaction de CD303 ou ILT7 avec des Ac, des particules de HCV ou des cellules exprimant BST2 [94]. Ce mécanisme de tolérisation des pDC ressemble aux voies BCR chez les lymphocytes B, avec CD303 jouant chez les pDC le rôle du BCR. Si VPRESB3 joue le même rôle dans la maturation de CD303 que dans celle du BCR, la sur-expression de VPRESB3 par LASV pourrait impacter la quantité de CD303 à la surface des cellules et donc faciliter l'acquisition d'un état "tolérant" par les pDC.

**Régulation globale** Dans cette étude transcriptomique, nous avons obtenu assez peu de gènes régulés différemment. Nous avons évalué l'impact de ces gènes sur l'état des pDC en analysant *in silico* la régulation des voies de signalisation (Figure 2.7). Nous avons obtenu plus de voies statistiquement régulées dans les pDC infectées par MOPV (par rapport aux non-infectées) que dans les pDC infectées par LASV (par rapport aux non-infectées), ce qui reflète les observations faites au niveau des gènes. La majorité des voies sont liées à la réponse immunitaire, et reposent sur les mêmes gènes régulés (dont SOCS1, SOCS3, BCL, JAK3, IL1 $\beta$ ).

**Ces différentes techniques nous ont permis d'avoir une image globale de l'activation des pDC.** Par rapport à la réponse IFN-I, les résultats obtenus sont plus nuancés. L'activation des pDC par MOPV observée par RT-qPCR ne semble pas suffisante pour induire l'acquisition d'un phénotype activé. Les pDC infectées par LASV produisent plus d'IL-6, IL-15 et MCP-1 que celles infectées par MOPV. Au niveau transcriptomique, MOPV et LASV activent les pDC, mais l'amplitude de l'activation est plus importante avec MOPV par rapport à LASV.



**FIGURE 2.7: Voies régulées chez les pDC lors de l'infection par MOPV et LASV**

Des pDC ont été cultivées pendant 12h avec du milieu de culture (mock), MOPV ou LASV (MOI=1). Les ARNm cellulaires de 3 expériences indépendantes ont été quantifiés par amplification poly-A et séquençage nouvelle génération. L'analyse des pathways a été réalisée avec Ingenuity Pathway Analysis à partir des gènes significativement régulés ( $P_{value}$  ajustée < 0,05). Les gènes régulés dans chaque pathway sont indiqués sur le graphe.

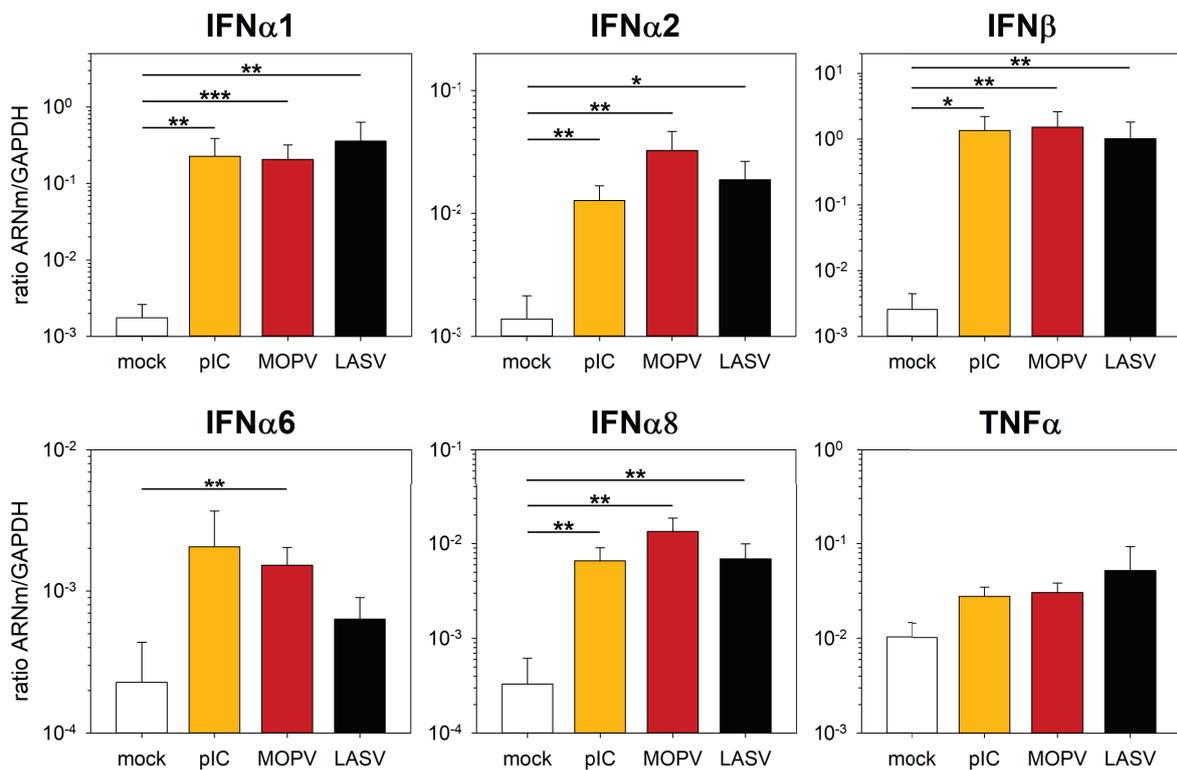
## 2 Détection et présentation d'antigènes : activation des cellules dendritiques myéloïdes par LASV

Tous les résultats présentés ici ont été obtenus avec des cellules dendritiques myéloïdes humaines primaires. Ces mDC ont été purifiées à partir de poches de sang prélevées le jour même et fournies par l'EFS. Les cellules ont été conservées sur la nuit avant infection.

Comme mentionné précédemment, les moDC sont souvent utilisées pour modéliser les mDC. Des résultats sur la réponse des moDC ont été obtenus dans le laboratoire, et seront mis en perspectives avec les résultats présentés ici [154, 9].

### 2.1 Réponse IFN-I des mDC à MOPV et LASV

Les mDC, contrairement aux pDC, ne sont pas spécialisées dans la réponse IFN-I. Elles disposent cependant de la machinerie nécessaire à une réponse IFN-I antivirale.



**FIGURE 2.8: MOPV et LASV induisent la production d'IFN-I par les mDC**  
 Des mDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), du pIC (150  $\mu$ g/mL), MOPV ou LASV (MOI=2). Les ARNm des IFN-I et du TNF $\alpha$  ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 8 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*),  $P_{value} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{value} < 0,001$  (\*\*\*)

Comme les mDC sont plus nombreuses *in vivo* que les pDC, l'IFN-I qu'elles produisent peut avoir un rôle essentiel [5]. Nous nous sommes donc intéressés à la production d'IFN-I des mDC en réponse à MOPV et LASV. Des mDC ont été infectées par MOPV ou LASV à MOI=2. Des mDC non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif (mock). Des mDC traitées avec du pIC (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) constituent un contrôle positif d'activation. Après 24h, les ARN de ces cellules ont été extraits. Les ARN codant pour les IFN-I et le  $\text{TNF}\alpha$  ont été quantifiés par RT-qPCR (Figure 2.8).

Les ARNm des IFN-I, mais pas du  $\text{TNF}\alpha$ , sont régulés par MOPV, LASV et le pIC. En présence de MOPV, les mDC produisent des IFN-I, en quantité équivalente à notre contrôle positif (pIC). Ces résultats montrent que MOPV est un bon activateur des mDC, mais aussi que les mDC sont plus réactives que les moDC. En effet, l'infection de moDC par MOPV induisait seulement une faible production d'IFN-I [154]. Les mDC infectées par LASV produisent aussi des d'IFN-I, en quantité équivalente à celles infectées par MOPV. Ce résultat était inattendu, car l'infection par LASV de moDC n'induisait pas de réponse IFN-I.

**Nous avons donc montré que MOPV, mais aussi LASV, induisait la production d'IFN-I par les mDC. Nous avons mis en évidence une première différence entre les mDC et le modèle moDC.**

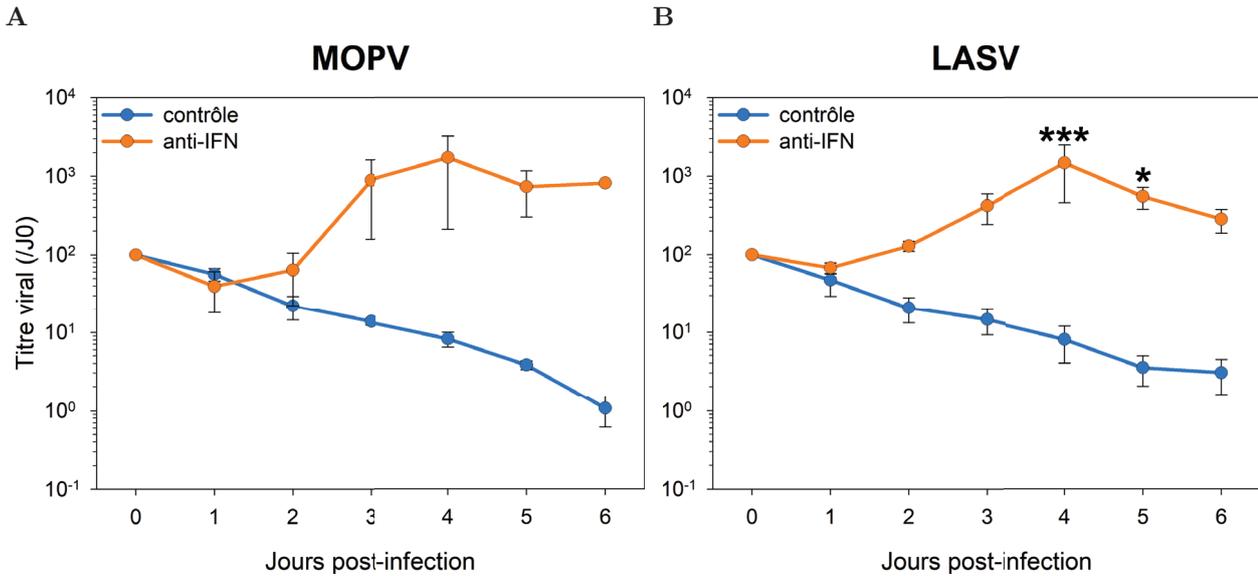
## 2.2 Infection des mDC par MOPV et LASV

Dans les modèles d'infection d'un hôte par LASV, les DC sont les premières cibles de l'infection. De plus, l'infection de moDC par MOPV et LASV est productive [9, 154]. Nous avons donc testé la permissivité des mDC primaires à MOPV et LASV.

### 2.2.1 Permissivité des mDC à l'infection

Des mDC ont été infectées par MOPV et LASV à MOI=0,1. De 0 à 6 jours p.i, le surnageant a été collecté et titré. Les titres de MOPV et LASV dans ces cultures sont présentés en figure 2.9 (courbes bleues "contrôle"). Le titre infectieux de MOPV et LASV diminue d'un facteur 5 environ chaque jour. Les mDC ne sont donc pas infectées de manière productive par MOPV et LASV, mais n'éliminent pas non plus activement le virus.

Pour compléter ces résultats, nous avons utilisé les virus fluorescent MOPV-mCh et LASV-mCh. Des mDC ont été infectées à MOI=0,1 par MOPV-mCh et LASV-mCh. Des images en fluorescence ont été prises chaque jour jusqu'à 5 jours p.i, et sont présentées en figure 2.10 (condition "contrôle"). Quelques cellules fluorescentes sont observées pour MOPV et pour LASV, à 1 et 2 jours p.i. Des mDC sont donc infectées par MOPV et LASV, mais ce phénomène semble rare et n'est observé qu'à des temps précoces après l'infection.



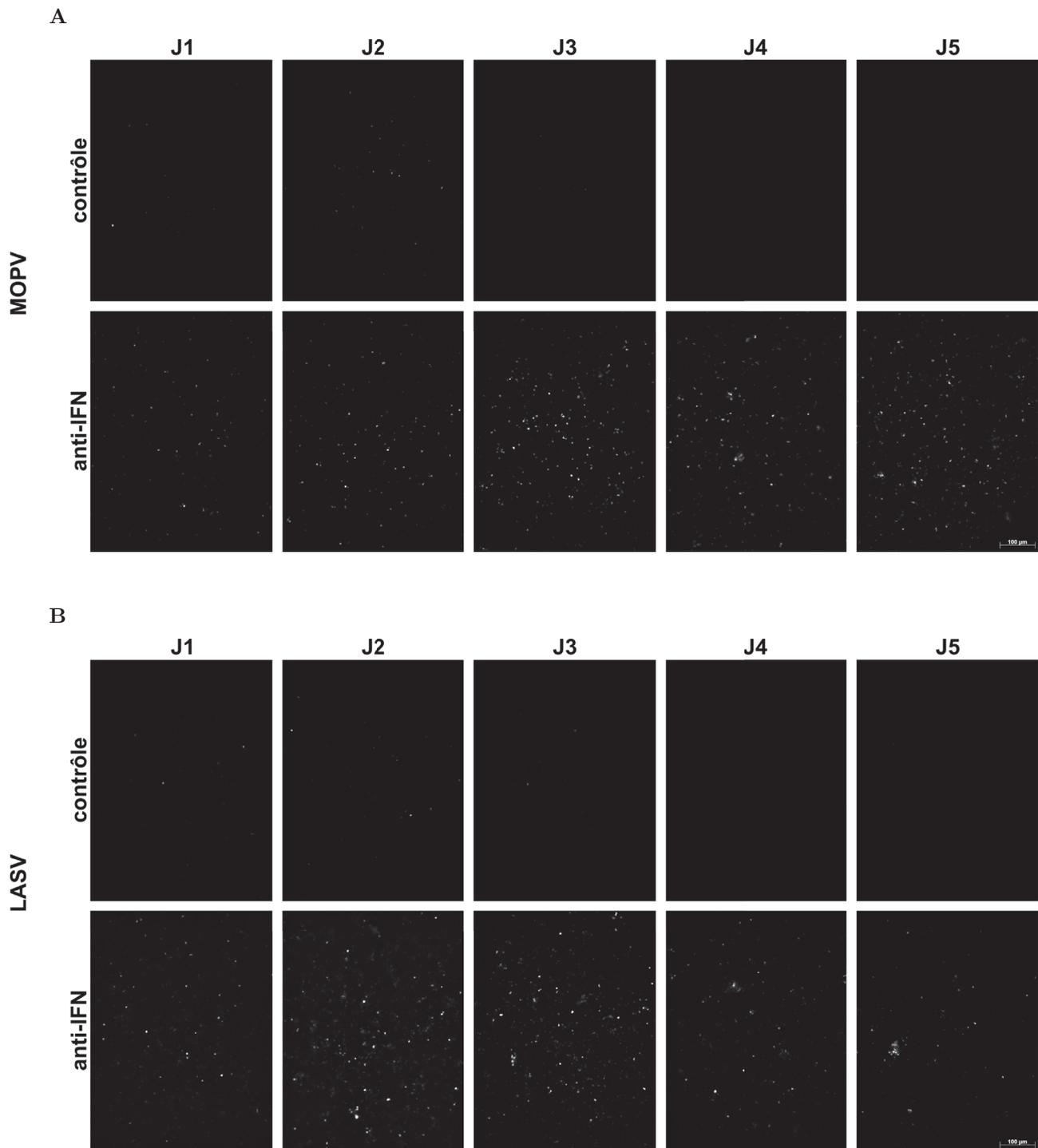
**FIGURE 2.9: Production de particules infectieuses par les mDC infectées par MOPV et LASV**

Des mDC ont été traitées avec un cocktail d'Ac neutralisant la réponse IFN-I autocrine et paracrine (anti-IFN), ou les isotypes contrôles correspondant (contrôle). Elles ont été infectées par MOPV (A) ou LASV (B) à MOI=0,1. De 0 à 6 jours p.i, le surnageant a été prélevé et titré. Les graphes représentent la moyenne et l'ES de 3 expériences indépendantes.

### 2.2.2 Contrôle de l'infection par la réponse IFN-I

Contrairement aux moDC, les mDC ne sont pas productivement infectées par MOPV et LASV. Nous avons testé si cette différence était liée aux différences de réponse IFN-I entre mDC et moDC. Nous avons donc utilisé un cocktail d'Ac neutralisants ciblant la réponse IFN : anti-IFN $\alpha$ , anti-IFN $\beta$  et anti-IFNAR. Ce cocktail "anti-IFN" nous permettait de neutraliser les effets autocrines et paracrines de la réponse IFN-I. Comme contrôle, nous avons utilisé un cocktail des isotypes correspondant.

Les mDC traitées avec les cocktails anti-IFN ou contrôle ont été infectées par MOPV ou LASV à MOI=0,1. L'évolution du titre viral dans le surnageant de culture de 0 à 6 jours p.i est présenté en figure 2.9. En présence des Ac neutralisant (anti-IFN, courbes oranges), les titres de MOPV et LASV augmentent et atteignent un maximum autour de 4 jours p.i avant de redescendre. Ces courbes sont semblables aux cinétiques de répllication de MOPV et LASV. Un test similaire a été réalisé avec MOPV-mCh et LASV-mCh (Figure 2.10) : suite au traitement avec les Ac anti-IFN, nous avons observé des cellules fluorescentes, ce qui confirme l'infection des mDC. Ainsi la neutralisation de la réponse IFN autocrine et paracrine est suffisante pour obtenir une infection productive des mDC.



**FIGURE 2.10: Infection des mDC par MOPV et LASV fluorescents**

Des mDC ont été traitées avec un cocktail d'Ac neutralisant la réponse IFN-I autocrine et paracrine (anti-IFN), ou les isotypes contrôles correspondant (contrôle). Elles ont été infectées par MOPV-mCh (A) ou LASV-mCh (B) à MOI=0,1. De 0 à 6 jours p.i, des photos ont été prises en fluorescence rouge pour détecter la mCherry. Images représentatives de 3 expériences indépendantes.

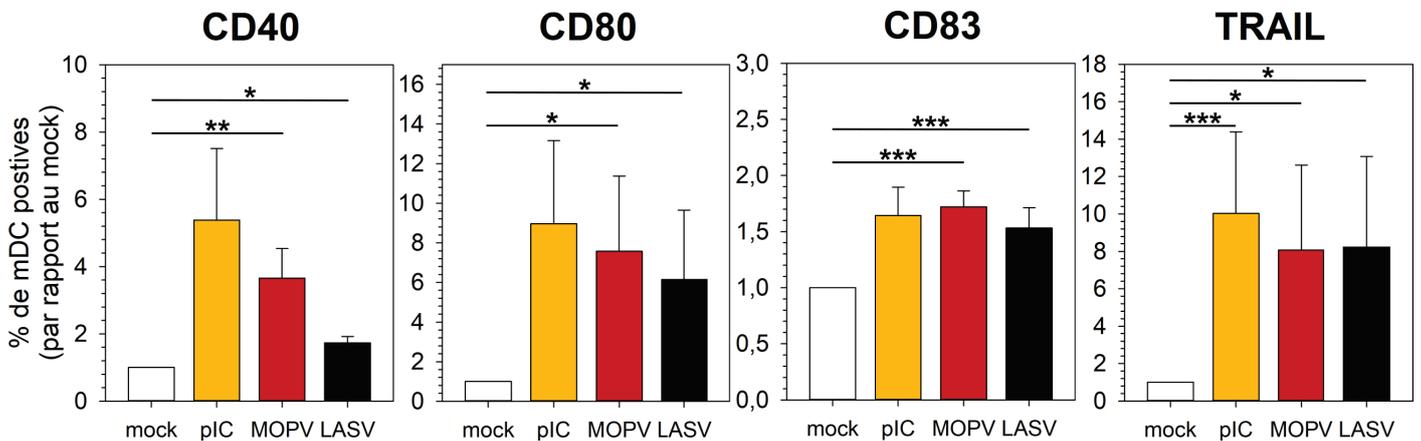
Les mDC sont donc permissives à l'infection par MOPV et LASV. Cependant, la production d'IFN-I par les mDC inhibe très rapidement l'infection. Les différences d'infektivité entre moDC et mDC sont donc imputables aux différences de réponse IFN-I.

## 2.3 Activation des mDC par MOPV et LASV

Après avoir étudié la réponse des mDC à MOPV et LASV en nous focalisant sur la production d'IFN-I, nous avons utilisé différentes techniques pour avoir une vision plus globale. Avec la cytométrie en flux, nous avons observé les changements d'expression des marqueurs membranaires. Avec le Luminex, nous avons étudié un large panel de cytokines produites par les mDC. Et enfin par séquençage, nous avons analysé les modifications transcriptomiques.

### 2.3.1 Marqueurs membranaires

Des mDC infectées par MOPV ou LASV ont été analysées 24h p.i. Les marqueurs d'activation CD40, CD80, CD83 et TRAIL ont été quantifiés par cytométrie en flux (Figure 2.11 et 2.12). L'infection par MOPV induit une régulation positive de ces marqueurs par les mDC. L'infection par LASV induit une régulation similaire. Le marqueur CD40 semble plus faiblement exprimé lors de l'infection par LASV par rapport à l'infection par MOPV, mais les différences ne sont pas significatives. Les deux virus induisent donc une activation comparable des mDC.



**FIGURE 2.11: Les mDC expriment des marqueurs cellulaires d'activation en réponse à MOPV et LASV**

Des mDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), du pIC (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), MOPV ou LASV (MOI=2). L'expression de molécules d'activation à la surface des mDC a été quantifiée par cytométrie en flux. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 5 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{\text{value}} < 0,05$  (\*),  $P_{\text{value}} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{\text{value}} < 0,001$  (\*\*\*) .

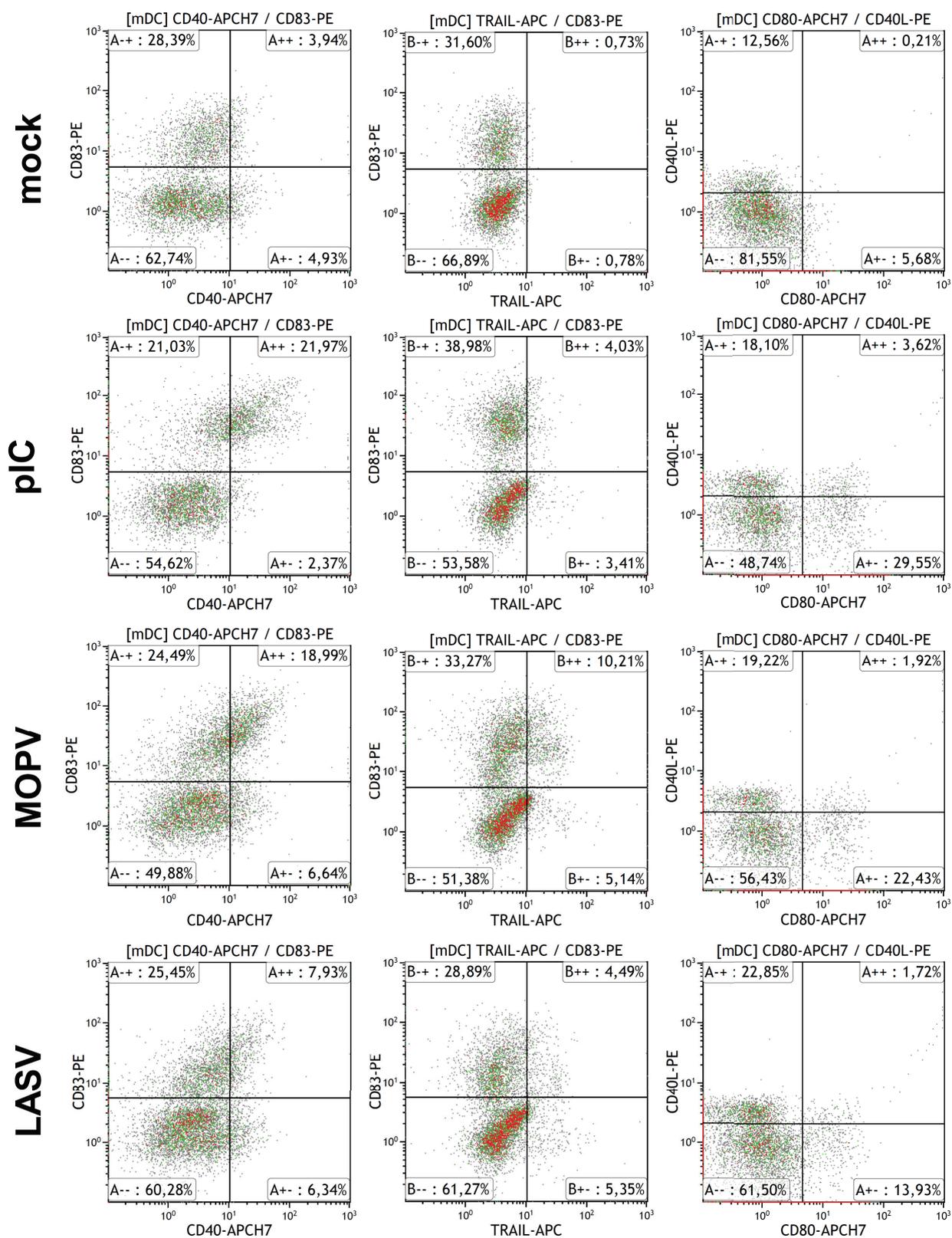


FIGURE 2.12: Illustration de l'activation des mDC quantifiée par cytométrie en flux

Ainsi l'infection par MOPV et LASV induit l'acquisition d'un phénotype activé chez les mDC.

### 2.3.2 Molécules sécrétées

Des mDC ont été infectées par MOPV ou LASV (MOI=2). Après 24h, 50 cytokines et chémokines ont été dosées dans le milieu de culture par Luminex. Les molécules pour lesquelles nous avons obtenu des différences significatives entre les conditions mock,

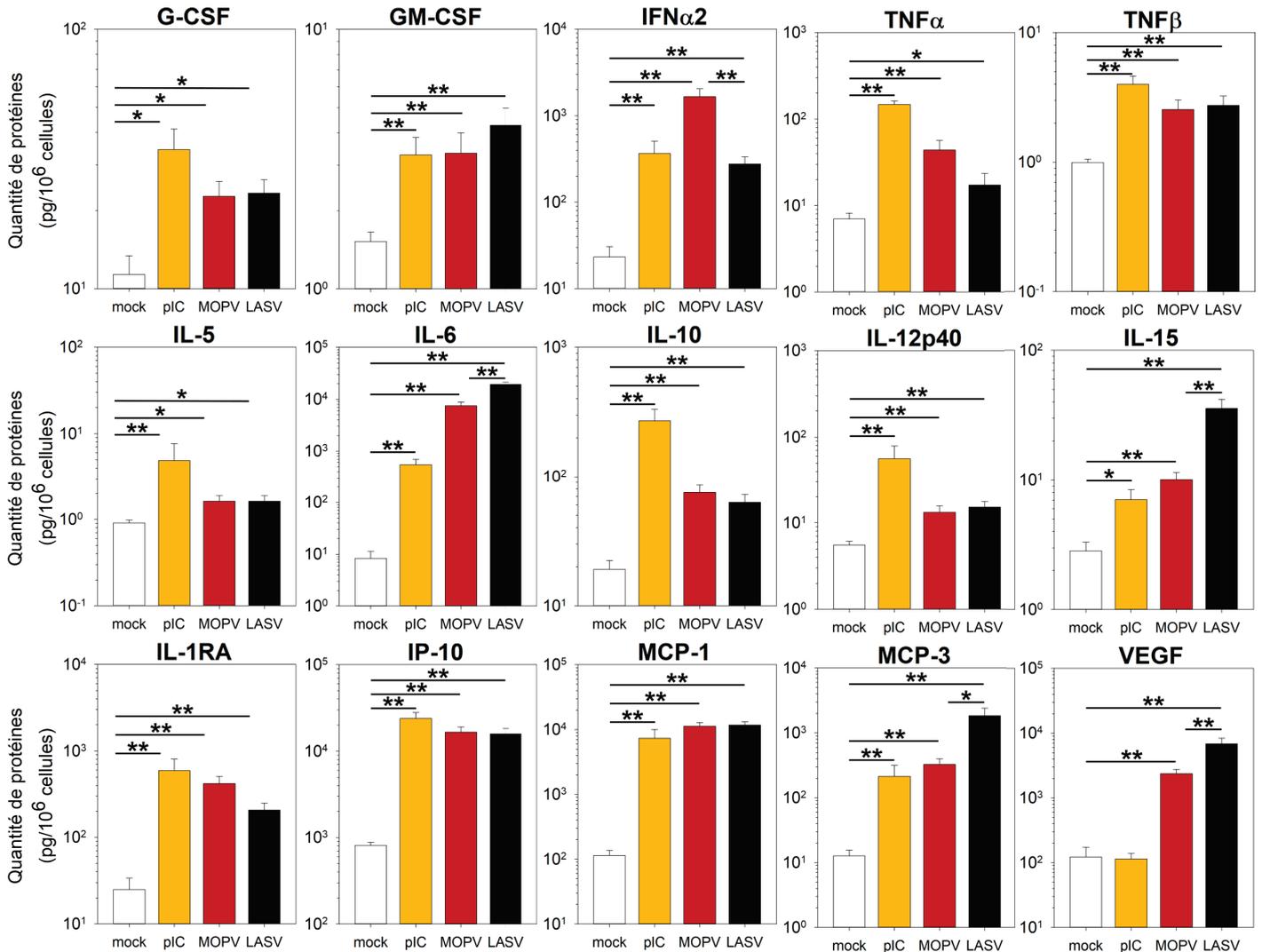


FIGURE 2.13: Cytokines produites par les mDC en réponse à MOPV et LASV

Des mDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), du pIC (150  $\mu$ g/mL), MOPV ou LASV (MOI=2). Les cytokines présentes dans le milieu de culture ont été quantifiées par luminex. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 5 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*),  $P_{value} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{value} < 0,001$  (\*\*\*) .

MOPV et LASV sont présentées dans la figure 2.13.

MOPV et LASV induisent chez les mDC la production de chémokines (MCP-1, MCP-3, IP-10), facteurs de croissance (VEGF, G-CSF, GM-CSF) et cytokines pro-inflammatoires (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, and  $\text{TNF}\alpha$ ). La majorité de ces molécules ont été identifiées chez des patients atteints de FHV, en particulier dans les stades terminaux de la maladie [66]. Les mDC infectées par MOPV produisent plus d' $\text{IFN}\alpha 2$  que celles infectées par LASV. Une telle différence a été obtenue par RT-qPCR, mais n'était pas significative (Figure 2.8).

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus pour IL-6, IL-15, VEGF et MCP-3. En effet, les mDC infectées par LASV produisent ces molécules en quantités plus importantes que les mDC infectées par MOPV. Comme mentionné précédemment, l'IL-6 a été associée dans de nombreuses études aux cas sévères de FHV [23, 10, 206]. La production d'IL-15 a aussi été associée aux cas les plus sévères de CCHF [157]. Dans les cas de dengue hémorragique, VEGF a été corrélé à la perméabilisation vasculaire et la sévérité de la maladie [224]. Récemment, MCP-3 a été identifié chez les PNHs infectés par le virus Ebola [29]. Ces quatre molécules pourraient être impliquées dans les cas de LASV, mais ne sont pas forcément produites par les mDC *in vivo*.

### 2.3.3 État transcriptionnel

Des mDC ont été infectées par MOPV et LASV (MOI=1) ou non infectées. 24h p.i, les ARN cellulaires ont été extraits et quantifiés par amplification poly-A et séquençage nouvelle génération. Par comptage des reads correspondant à chaque gène, nous avons obtenu l'expression différentielle de ces gènes entre les mDC non-infectées, infectées par MOPV et infectées par LASV.

**Gènes régulés** Les gènes illustrés en figure 2.14 sont significativement régulés entre MOPV et LASV ( $P_{\text{value}}$  ajustée  $<0,05$ ). La colonne centrale correspond à la comparaison MOPV/LASV. Les autres colonnes correspondent à l'expression différentielle entre les mDC infectées (par MOPV ou LASV) et les mDC non-infectées.

Globalement, les gènes régulés positivement (ou négativement) lors de l'infection par MOPV sont aussi régulés positivement (ou négativement) lors de l'infection par LASV. Cependant, l'amplitude de ces régulations est plus importantes pour MOPV que pour LASV, induisant des différences significatives entre ces deux conditions. De nombreux gènes différentiellement régulés par MOPV et LASV sont impliqués dans la réponse immunitaire : IFN ( $\text{IFN}\alpha 6$ ,  $\text{IFN}\alpha 8$ ,  $\text{IFN}\alpha 10$  et  $\text{IFN}\omega 1$ ), pro-inflammatoires (IL15, IL15RA, SIGLEC7 et AXL), communication cellulaire (CD101, CD200, HLA-W, MS4A4A et HOMER3). Nous avons aussi identifié des gènes impliqués dans la croissance et la mort cellulaire (Fas, BCL2L14, PRAME et PID1), l'adhésion et la mobilité (SYNPO2, DMD, COL23A1 et VCAM1) ou les deux (ANTXR1, AXL et SDC2). De manière plus surprenante, nous avons aussi obtenu des gènes du métabolisme des lipides (ELOVL7, SCD5, METRNL, LRP5, APOE, APOC1 et FUCA1),

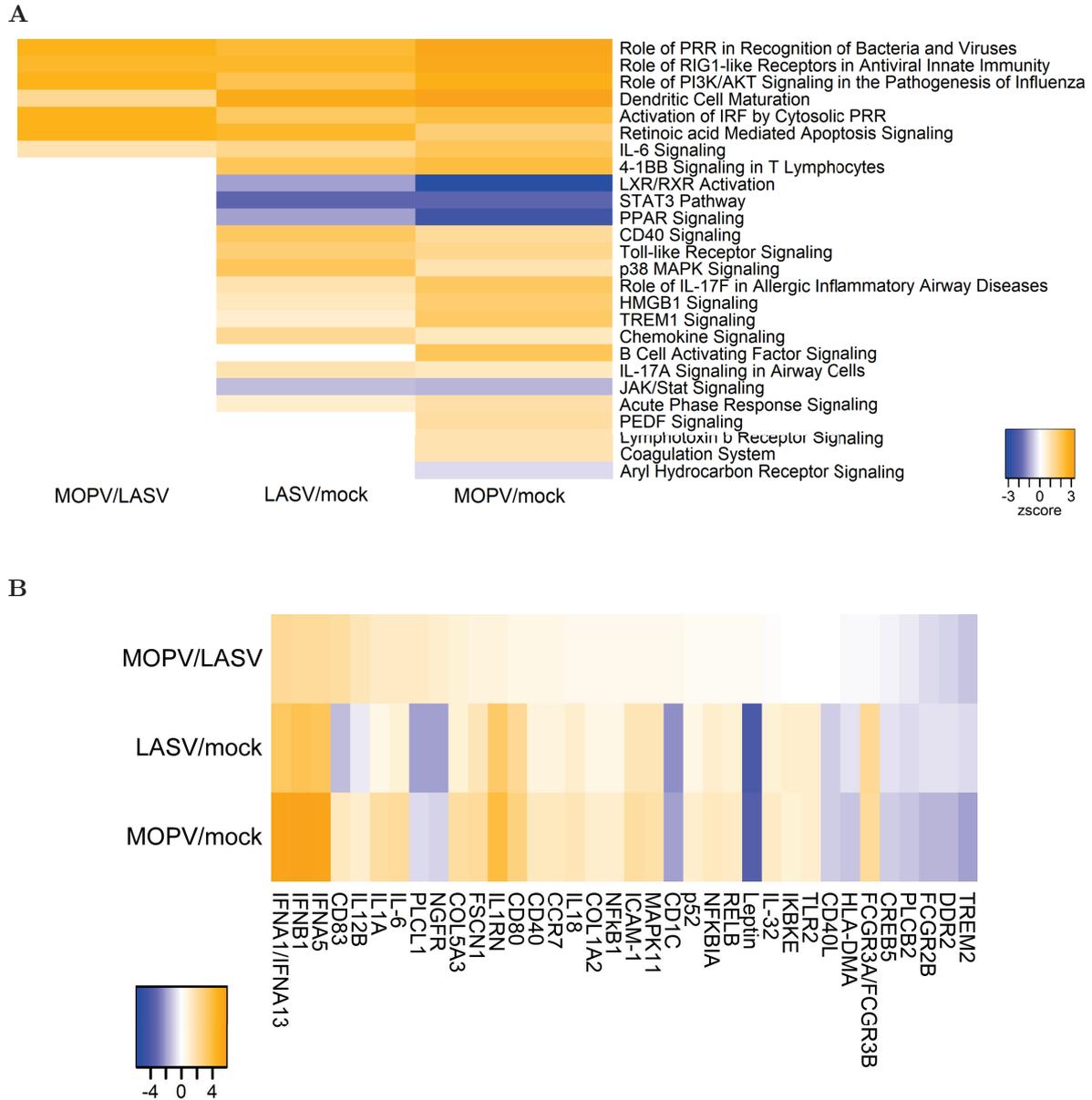
de la régulation des molécules oxydatives (SPSB4, DDAH2 et NOXA1) et du transport ionique (SLCO5A1, TMEM150C, CLIC2, FAM20C et TNNI2). Le lien entre les



**FIGURE 2.14: Régulation transcriptomique des mDC lors de l'infection par MOPV et LASV**

Des mDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), MOPV ou LASV (MOI=1). Les ARNm cellulaires de 3 expériences indépendantes ont été quantifiés par amplification poly-A et séquençage nouvelle génération. La colonne centrale (MOPV/LASV) correspond à l'expression différentielle des gènes des mDC infectées par MOPV par rapport à celles infectées par LASV. Les autres colonnes correspondent à l'expression différentielle des gènes des mDC infectées par MOPV ou LASV par rapport à celles non-infectées, pour chaque réplicat (1 à 3) ou en moyenne (mean). Pour tous les gènes présentés, les différences d'expression LASV/MOPV étaient statistiquement significatives ( $P_{value}$  ajustée < 0,05).

lipides et la réponse aux FHV a déjà été souligné par d'autres études : la présence de lipide dans le sérum des patients atteints de LASF est associée avec un syndrome fébrile [64] ; les voies LCR/RXR, à l'intersection entre le métabolisme des lipides et la réponse immunitaire, sont impliquées dans la réplication du virus de la Dengue [195].



**FIGURE 2.15: Les gènes modulés par MOPV et LASV impactent l'état d'activation global des mDC**

Des mDC ont été cultivées pendant 24h avec du milieu de culture (mock), MOPV ou LASV (MOI=1). Les ARNm cellulaires de 3 expériences indépendantes ont été quantifiés par amplification poly-A et séquençage nouvelle génération. L'analyse des pathways a été réalisée avec Ingenuity Pathway Analysis à partir des gènes significativement régulés ( $P_{value}$  ajustée < 0,05). **A**) Zscores des pathways. **B**) Expression différentielle des gènes du pathway "Dendritic cell maturation".

**Voies régulées** Les gènes différentiellement régulés entre les mDC infectées par MOPV et celles infectées par LASV peuvent sembler peu nombreux, mais ils ont un impact important au niveau de l'état de la cellule. En effet, un certain nombre de voies sont significativement régulées entre MOPV et LASV (Figure 2.15A). La majorité de ces voies sont impliquées dans la réponse immunitaire et sont activées chez les mDC infectées par MOPV comparées à celle infectées par LASV (reconnaissance des virus et bactéries par les PRR ou RLR, signaling de la PI3K ou de l'IL-6, ...). Ces différences reposent sur un ensemble de gènes régulés communs, dont IFN-I, NF $\kappa$ B, CD40 et CD80. Les voies de maturation des DC sont aussi suractivées par MOPV. Les gènes majeurs impliqués sont IFN-I, CD40, CD83, CCR7, IL-6, NF $\kappa$ B (p50), MDA5, et Fas, qui sont surexprimés lors de l'infection par MOPV mais pas par LASV (Figure 2.15B). Ces différences au niveau transcriptomique soulignent la plus grande immunogénicité de MOPV comparé à LASV dans notre modèle de mDC primaires.

**Ces études à une échelle plus large ont permis d'identifier des différences dans la réponse des mDC à MOPV et à LASV. Quelques cytokines, en particulier IL-6, sont produites en plus grande quantité lors de l'infection par LASV. L'analyse transcriptomique a montré une activation globale des mDC plus importante en réponse à MOPV par rapport à LASV.**

### 3 Initiation de la réponse adaptative : activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques myéloïdes infectées

Une des caractéristiques majeures des mDC est la présentation antigénique. Elles sont capables, après avoir rencontré un pathogène, d'en traiter les Ag et de les présenter à d'autres cellules immunitaires, dont les LT. La cross-présentation mDC/LT est nécessaire à l'initiation d'une réponse T spécifique. Nous avons donc évalué la capacité des mDC infectées par MOPV ou LASV à activer des LT autologues.

#### 3.1 Modèle de coculture mDC-T

Nous avons mis en place un modèle de coculture de mDC infectées et de LT autologues. Ce modèle est adapté des cocultures moDC/LT précédemment développées au laboratoire, et est schématisé par la figure 2.16 [156]. Les PBMC sont purifiées

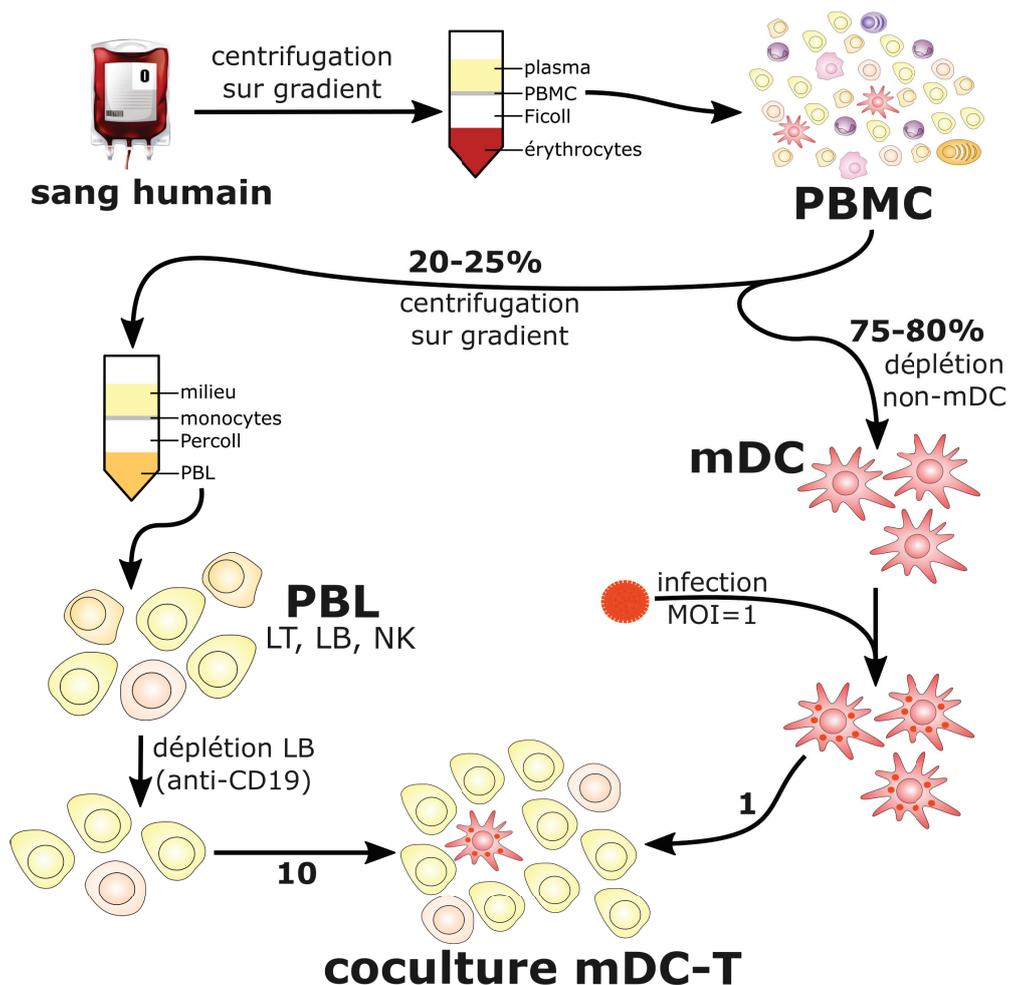


FIGURE 2.16: Protocole de coculture mDC/LT

à partir du sang total par centrifugation sur gradient (Ficoll). 75-80% des PBMC sont utilisées pour obtenir des mDC, par sélection négative. 20-25% des PBMC sont centrifugées sur gradient de Percoll pour obtenir les PBL (LT, lymphocytes B et NK), puis déplétées des lymphocytes B. On obtient ainsi un mélange de LT CD4 (environ 55%), LT CD8 (environ 30%) et NK (environ 15%). Les mDC sont ensuite infectées par MOPV ou LASV (ou non infectées, condition mock) pendant 1h et mises en cultures avec les LT à un ratio 1 mDC pour 10 LT. L'activation des mDC est quantifiée à 1 et 2 jours p.i, et celle des LT à 2, 12 et 15 jours p.i.

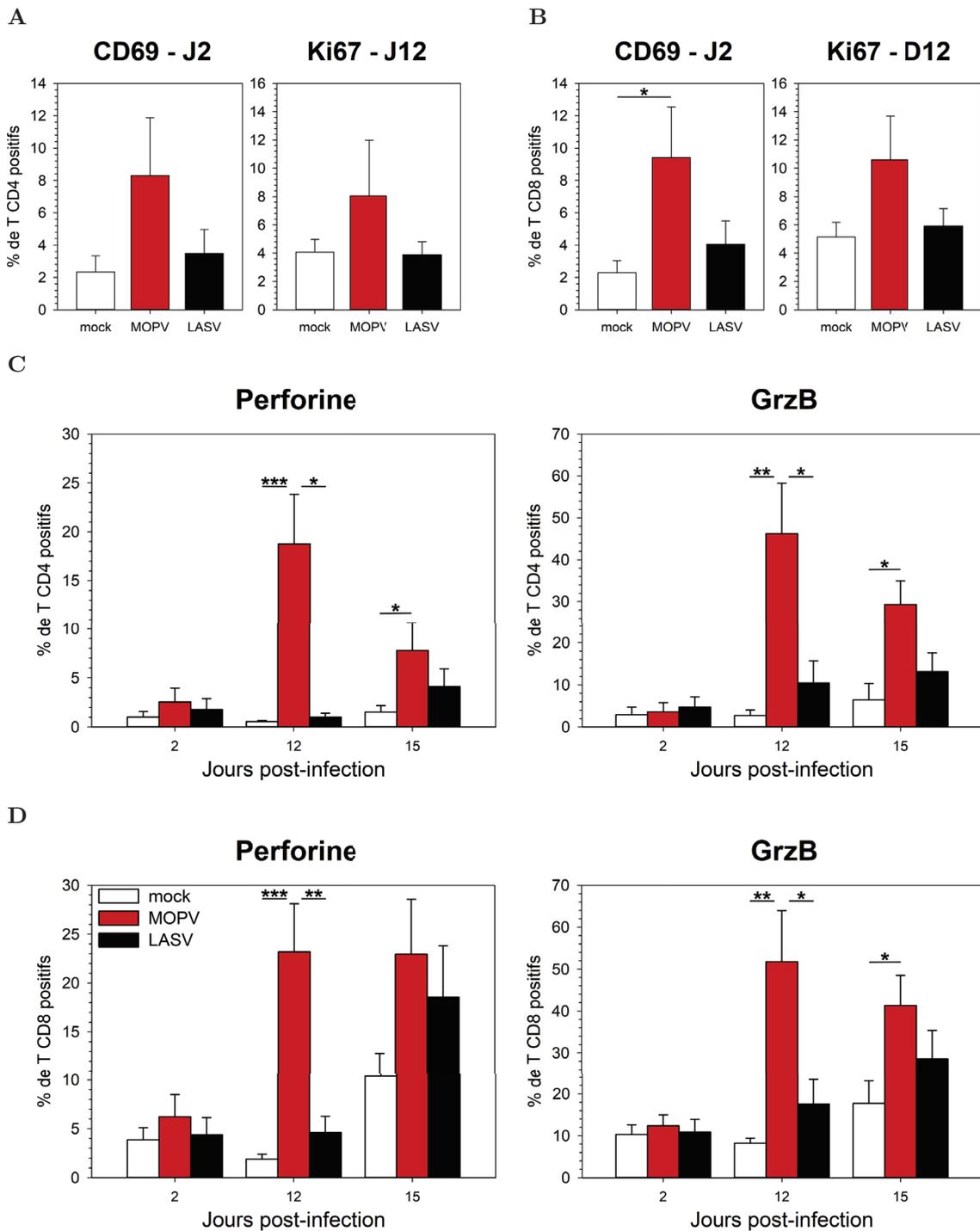
### 3.2 Activation des LT en coculture

Des LT ont été mis en culture avec des mDC infectées par MOPV ou LASV. Après 2, 12 ou 15 jours, les cellules ont été récoltées et les LT ont été analysés par cytométrie en flux. Des marquages de phénotypes CD3, CD4 et CD8 nous ont permis de discriminer LT CD4, LT CD8 et NK. Le marqueur d'activation CD69 a été quantifié à J2. Les molécules cytotoxiques GrzB et perforine ont été quantifiés à J12 et J15. Le marqueur de prolifération Ki67 a été quantifié à J12. Les résultats sont illustrées par la figure 2.18, et la figure 2.17 correspond à la quantification des cellules positives pour ces marqueurs.

CD69 est un marqueur précoce d'activation des LT. À 2 jours p.i, la coculture avec des mDC infectées par MOPV induit une sur-expression de CD69 par les LT CD4 (Figure 2.17A) et CD8 (Figure 2.17B). Les mDC infectées par LASV n'induisent pas cette activation. Après 12 jours de coculture, les LT en présence de mDC infectées par MOPV expriment des quantités importantes de GrzB et perforine (Figures 2.17C et 2.17D). La production de GrzB et perforine par ces LT est encore élevée à 15 jours p.i. Au contact de mDC infectées par LASV, les LT CD4 et CD8 produisaient pas ou peu de GrzB et perforine, que ce soit 12 ou 15 jours p.i. L'augmentation de l'expression de Ki67 par les LT au contact de mDC infectées par MOPV (mais pas de mDC infectées par LASV) indique une prolifération des LT CD4 (Figure 2.17A) et CD8 (Figure 2.17B).

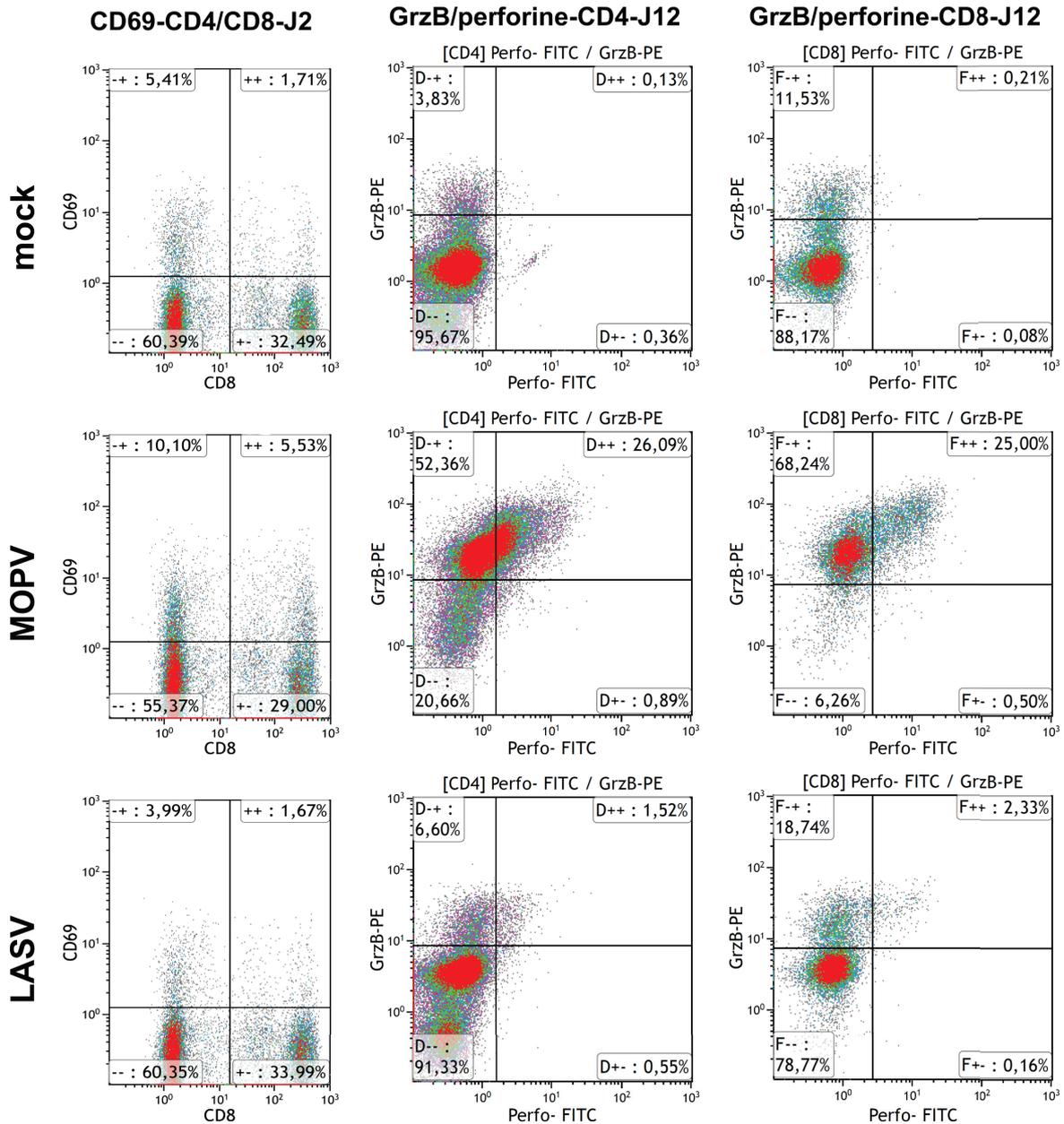
En présence de mDC infectées par MOPV, les LT CD4 et CD8 sont activés, produisent des molécules cytotoxiques et prolifèrent. Les mDC infectées par LASV n'induisent pas cette activation des LT. Ces résultats sont semblables avec ceux obtenus en coculture moDC/LT [156]. Cependant, les mDC semblent être plus immunogènes que les moDC : une simple stimulation avec des mDC infectées par MOPV est suffisante pour induire une réponse T, alors que des restimulations étaient nécessaires avec les moDC.

Les résultats précédents obtenus en coculture moDC/LT ont montré que les LT stimulés avec des moDC infectées par MOPV étaient capables de libérer du GrzB au contact de cellules infectées par MOPV, contrôlant l'infection. Nous n'avons pas pu le tester avec notre modèle, mais il est probable que les LT exprimant GrzB et perforine soient capables de lyser des cellules infectées par MOPV. En effet, les LT naifs ne



**FIGURE 2.17: Les mDC infectées par MOPV, mais pas celles infectées par LASV, activent les LT en coculture**

Des mDC ont infectées par MOPV ou LASV (MOI=1) et cultivées pendant 2, 12 ou 15 jours avec des LT. L'activation des LT CD4 (A et C) et CD8 (B et D) a été quantifiée par cytométrie en flux. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 7 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*) et  $P_{value} < 0,01$  (\*\*).



**FIGURE 2.18: Illustration de l'activation des LT en coculture**

Les graphes sont représentatifs de 7 expériences indépendantes. Les quantifications correspondantes sont présentées dans la figure 2.17.

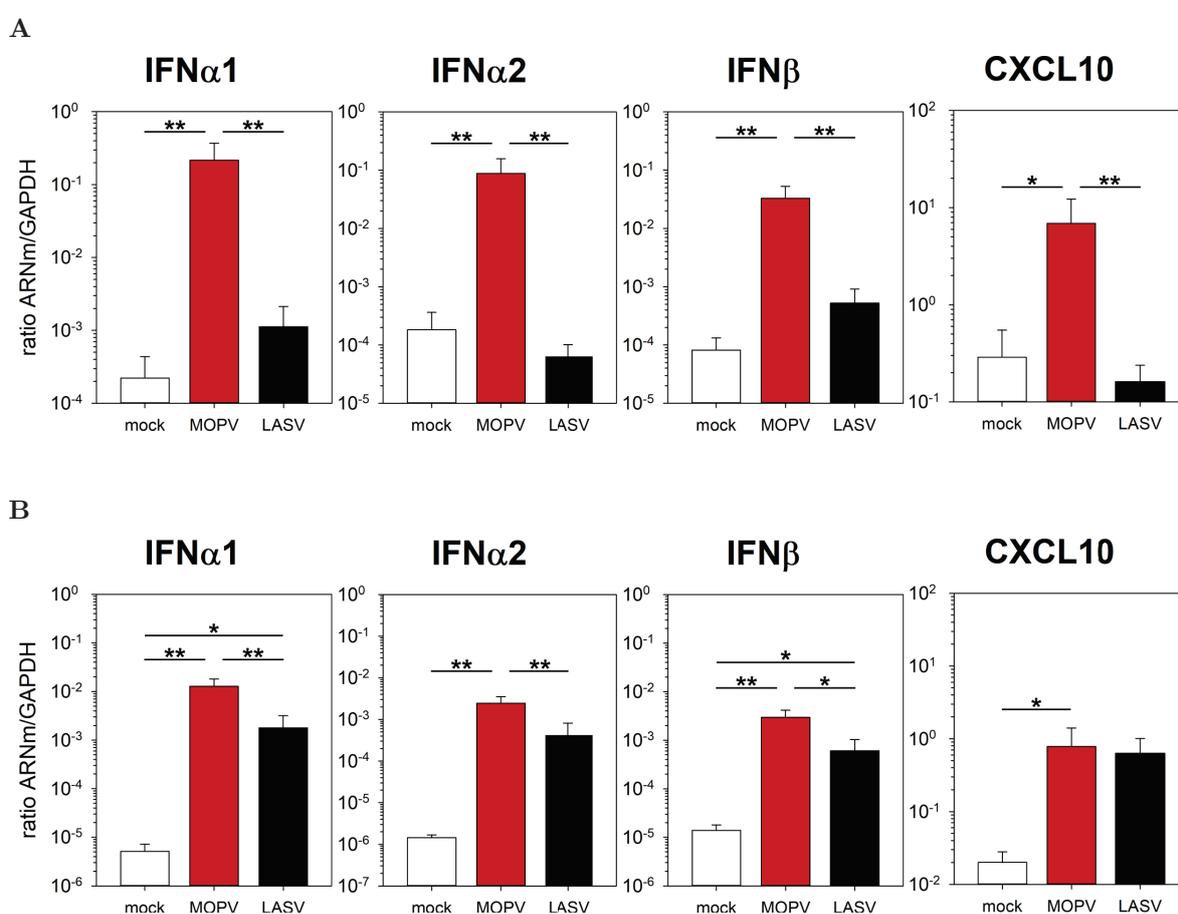
contiennent pas de granules cytotoxiques, et l'expression de GrzB et perforine n'est possible qu'après stimulation du TCR et prolifération [137, 97]. Les LT exprimant GrzB et perforine obtenus après stimulation avec des mDC infectées par MOPV sont donc probablement des LT cytotoxiques fonctionnels.

Les mDC infectées par MOPV sont donc capables d'induire une activation des LT, leur prolifération et leur maturation en LT cytotoxiques. Au contraire, les mDC infectées par LASV n'induisent pas d'activation des LT.

### 3.3 Réponse des mDC en coculture avec des LT

#### 3.3.1 Réponse IFN-I

Les mDC infectées par MOPV ou LASV et mises en culture avec des LT ont été récoltées 24 ou 48h p.i. Les ARNm des gènes des IFN-I et de CXCL10 ont été quantifiés par RT-qPCR (Figure 2.19). À 24h p.i, les ARNm des IFN-I sont surexprimés en présence de MOPV par rapport à la condition mock (Figure 2.19A). Le facteur de sur-expression est de 1000 pour l'IFN $\alpha$ 1 et de 500 pour l'IFN $\alpha$ 2. Pour les mDC seules infectées par MOPV (Figure 2.8), le facteur de sur-expression était de 100 pour l'IFN $\alpha$ 1 et de 20 pour l'IFN $\alpha$ 2 (voire figure 2.8). Ainsi, le contact avec les LT influence la réponse IFN-I des mDC à MOPV : elle augmente d'un facteur 10 pour l'IFN $\alpha$ 1 et 25



**FIGURE 2.19: Seules les mDC infectées par MOPV produisent des IFN-I en coculture**

Des mDC ont été infectées par MOPV ou LASV (MOI=1) et cultivées pendant 24h (A) ou 48h (B) avec des LT. Les ARNm des IFN-I et de CXCL10 ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 7 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*) et  $P_{value} < 0,01$  (\*\*).

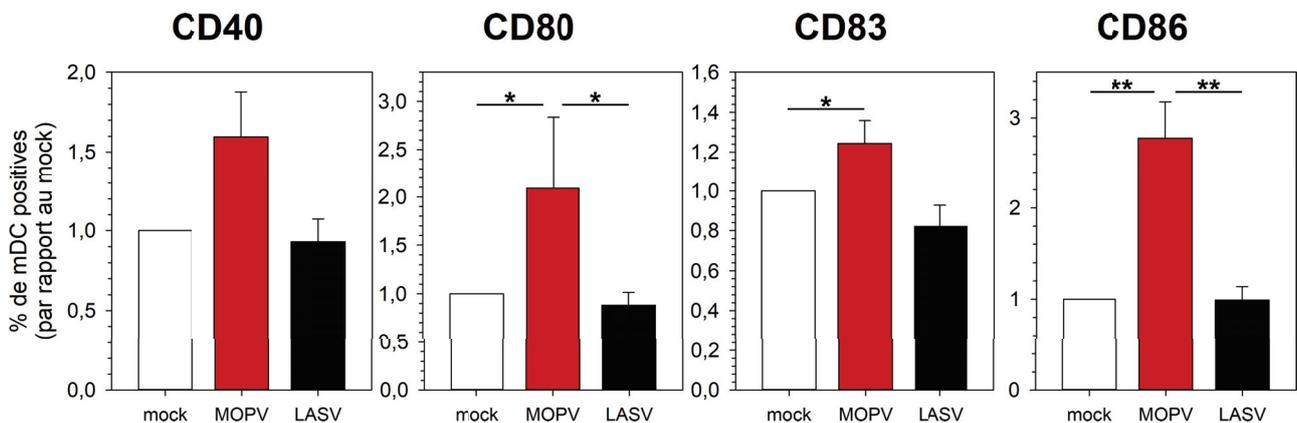
pour l'IFN $\alpha$ 2. De plus, la réponse IFN-I des mDC à MOPV est prolongée jusqu'à 48h p.i en coculture, ce qui n'était pas le cas pour les mDC seules (Figure 2.19B et données non présentées). La production d'IFN-I des mDC infectées par MOPV est donc plus importante et plus durable en coculture avec des LT.

Seules, les mDC infectées par LASV produisent des quantités d'IFN-I équivalentes à celles infectées par MOPV (Figure 2.8). De manière inattendue, les mDC infectées par LASV et cultivées avec des LT ne produisent ni IFN-I ni CXCL10 à 24h p.i (Figure 2.19A). La coculture avec des LT inhibe donc complètement la réponse IFN-I des mDC à LASV. À 48h p.i, la réponse IFN-I des mDC infectées par LASV est supérieure à celle des mDC non infectées, mais toujours inférieure à celle des mDC infectées par MOPV (Figure 2.19B). Cette modulation de la réponse des mDC en coculture suggère un dialogue entre mDC et LT, qui n'influence pas seulement l'activation des LT mais aussi la réponse des mDC.

### 3.3.2 Marqueurs d'activation

Des mDC en coculture ont été analysées par cytométrie en flux à 48h p.i. Des marquages de phénotypes Lin1/HLA-DR/CD11c permettent d'identifier les mDC dans la coculture. Les marqueurs d'activation CD40, CD80, CD83 et CD86 ont été quantifiés chez les mDC (Figure 2.20).

Chez les mDC infectées par MOPV, on observe une régulation positive de CD40, CD80, CD83 et CD86. Au contraire, les mDC infectées par LASV se comportent de la même manière que celles non infectées. Ces données confirment l'inhibition de l'activation

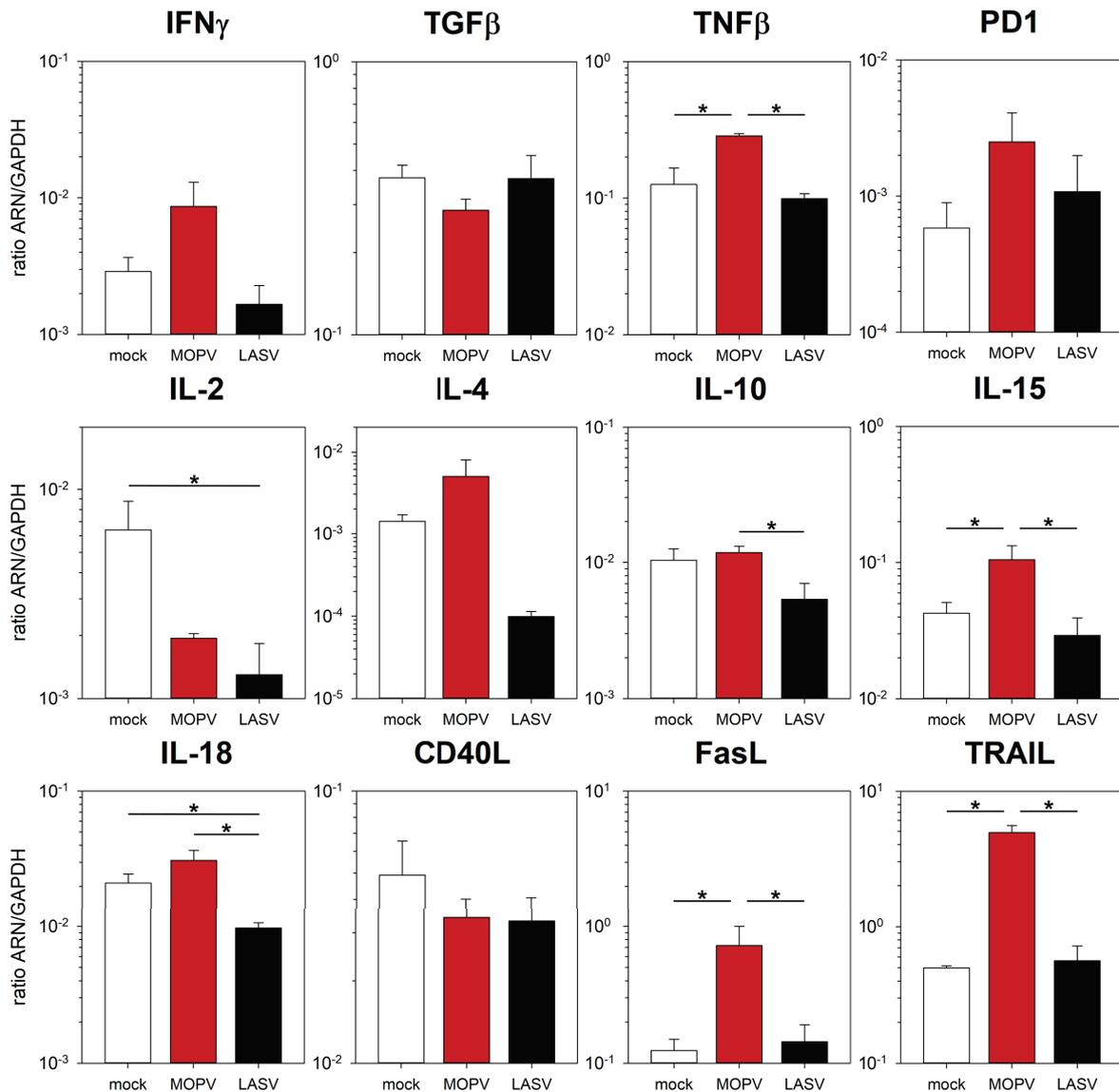


**FIGURE 2.20: Les mDC infectées par MOPV, mais pas celles infectées par LASV, sont activées en coculture avec des LT**

Des mDC ont été infectées par MOPV ou LASV (MOI=1) et cultivées pendant 48h avec des LT. L'expression de molécules d'activation à la surface des mDC a été quantifiée par cytométrie en flux. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 7 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*) et  $P_{value} < 0,01$  (\*\*).

des mDC infectées par LASV en coculture avec des LT.

En conclusion, la coculture avec des LT module la réponse des mDC à MOPV et LASV. Les mDC infectées par MOPV ont une réponse amplifiée et plus durable. Les mDC infectées par LASV ont une réponse inhibée et retardée.



**FIGURE 2.21: Quantification de médiateurs potentiels du dialogue mDC/LT**  
Des mDC ont infectées par MOPV ou LASV (MOI=1) et cultivées pendant 24h avec des LT. Les ARNm de cytokines et chémokines ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 4 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*),  $P_{value} < 0,01$  (\*\*) et  $P_{value} < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.3.3 Facteurs solubles impliqués dans le dialogue mDC/LT

Nous avons montré que les mDC infectées par MOPV, mais pas celles infectées par LASV, étaient capables d'activer les LT. Nous avons aussi observé que les LT étaient capables d'influencer la réponse des mDC à MOPV et LASV. Ces phénomènes ont été observés dès 24h p.i. Il semble donc y avoir un dialogue entre mDC et LT. Le résultat de ce dialogue est une activation réciproque des LT et des mDC dans le cadre de l'infection par MOPV, et l'inhibition de la réponse des mDC dans le cadre de l'infection par LASV. Ces échanges mDC/LT pourraient dépendre de contacts cellulaires ou de médiateurs solubles. Nous avons testé différentes molécules impliquées dans les communications cellulaires pour décrire les interactions mDC/LT.

Les ARNm des cocultures ont été extraits à 24h p.i et des gènes d'intérêt ont été quantifiés par RT-qPCR (Figure 2.21). Parmi les facteurs testés, les ARNm  $IFN\gamma$ ,  $TNF\beta$ , IL-15, FasL et TRAIL sont surexprimés dans les cocultures MOPV par rapport aux cocultures LASV et non infectées. Ces cytokines sont majoritairement produites par les LT et pourraient être impliquées dans l'amplification des réponses mDC et LT. Les NK, toujours présentes dans ce système, pourraient aussi produire de l' $IFN\gamma$  et exprimer TRAIL. L'IL-18, cytokine produite par les CPA, est régulée négativement dans la coculture LASV, ce qui confirme l'inhibition des mDC. Si tous ces facteurs pourraient être impliqués dans la réponse importante des mDC et des LT à MOPV, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes de régulation négative des mDC infectées par LASV en présence de LT.

**Parmi les facteurs testés, plusieurs sont produits en plus grande quantité dans les cocultures MOPV par rapport aux cocultures mock ( $IFN\gamma$ ,  $TNF\beta$ , FasL et TRAIL). Ils pourraient être impliqués dans l'induction de la réponse T et l'amplification de la réponse des mDC. Les cocultures LASV sont caractérisées par l'absence de ces facteurs, et la régulation négative d'IL-4 et IL-18. Les mécanismes d'inhibition de la réponse des mDC infectées par LASV en coculture ne sont pas encore élucidés.**

## 3.4 Rôles des différentes protéines virales dans l'immunogénicité de MOPV et LASV

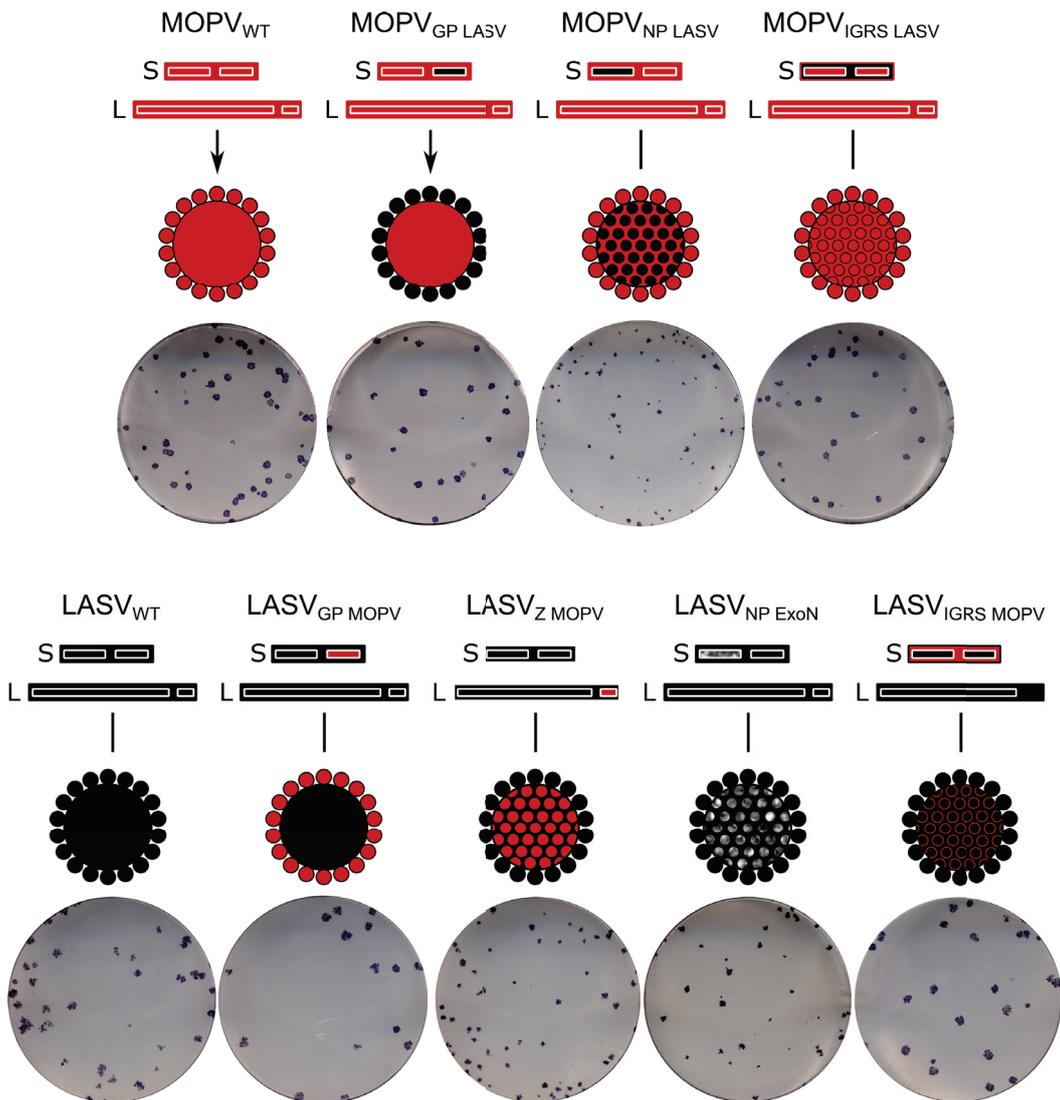
Ces études de cocultures mDC/T ont permis d'identifier des différences entre MOPV et LASV. Afin de mieux comprendre l'origine de ces différences, nous avons construit des virus chimères MOPV/LASV.

### 3.4.1 Virus chimères

Les chimères de MOPV et LASV ont été obtenues par génétique inverse. Les plasmides codant pour les segments S et L de MOPV et LASV ont été déplétés de certaines séquences : l'ORF de la GP, l'ORF de la NP ou la région intergénique (IGRS) pour

le segment S, l'ORF de la Z pour le segment L. Les séquences de MOPV (ou LASV) déplétées ont ensuite été remplacées par les séquences correspondantes de LASV (ou MOPV, respectivement). Ces plasmides ont été utilisés pour produire des virus chimères par génétique inverse. Nous avons obtenu les virus suivants (Figure 2.22) :

- MOPV<sub>GP LASV</sub> - MOPV avec la GP de LASV
- LASV<sub>GP MOPV</sub> - LASV avec la GP de MOPV
- MOPV<sub>NP LASV</sub> - MOPV avec la NP de LASV
- LASV<sub>Z MOPV</sub> - LASV avec la Z de MOPV
- MOPV<sub>IGRS LASV</sub> - MOPV avec l'IGRS de LASV
- LASV<sub>IGRS MOPV</sub> - LASV avec l'IGRS de MOPV

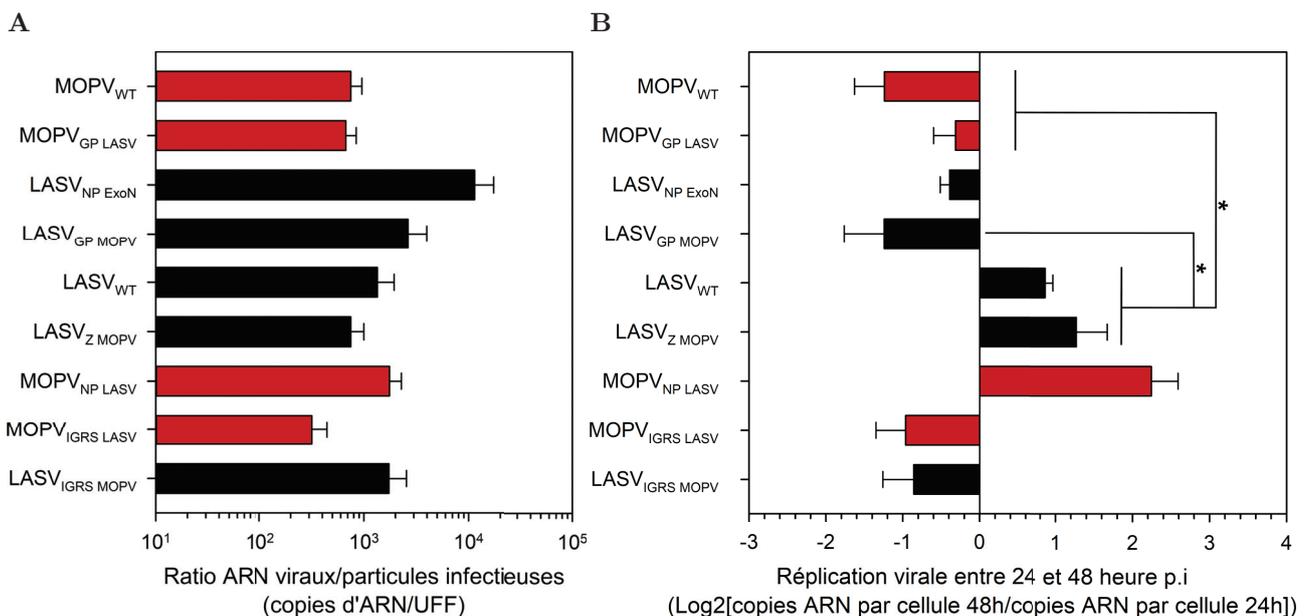


**FIGURE 2.22: Production de virus chimériques MOPV/LASV**

Pour les schémas, les parties rouges correspondent à MOPV et les noires correspondent à LASV. Les images montrent le phénotype des foyers infectieux des virus.

Les virus  $LASV_{NP\ MOPV}$  et  $MOPV_Z\ LASV$  n'étaient pas viables et ne sont donc pas inclus dans cette étude. Nous nous sommes aussi intéressés à  $LASV_{NP\ ExoN}$ , virus dont le site exonucléasique de la NP est muté et non fonctionnel. Les propriétés de ce virus, dont son immunogénicité accrue, sont décrites dans [34, 174].

Nous avons caractérisé ces virus sur cellules veroE6, et vérifié l'échange des protéines virales (données non présentées). Les virus  $MOPV_{IGRS\ LASV}$ ,  $MOPV_{NP\ LASV}$  et  $LASV_{NP\ ExoN}$  ont une croissance retardé sur veroE6. Nous avons obtenu les titres infectieux des stocks de virus chimères par titrage en immunomarquage. Nous avons aussi quantifié les génomes viraux par RT-qPCR. Le ratio copies de génomes/particules infectieuses, illustré par la figure 2.23A, est un indicateur de la quantité de particules défectives.  $MOPV_{WT}$  et  $LASV_{WT}$  ont des ratios génomes/particules infectieuses similaires. Les virus  $MOPV_{GP\ LASV}$ ,  $LASV_{GP\ MOPV}$  et  $LASV_{IGRS\ MOPV}$  sont proches virus sauvages. Les virus  $MOPV_{NP\ LASV}$ ,  $LASV_Z\ MOPV$  et  $MOPV_{IGRS\ LASV}$  ont des ratios génomes/particules infectieuses inférieurs à ceux des virus sauvages. Les virus chimères ne semblent donc pas présenter des défauts d'assemblages majeurs.  $LASV_{NP\ ExoN}$  a un ratio génomes/particules infectieuses supérieur aux autres virus, ce qui est en accord avec son phénotype atténué.



**FIGURE 2.23: Réplication des virus chimères en coculture mDC-T** Les barres rouges et noires correspondent aux virus avec une base MOPV et LASV, respectivement. **A)** Ratio ARN viraux/particules infectieuses dans les stocks des virus utilisés. **B)** Des mDC ont infectées par les virus chimères (MOI=1) et cultivées pendant 2 jours avec des LT. Les génomes viraux dans les cellules ont été quantifiés par RT-qPCR. La réplication virale intracellulaire est estimée par la quantité d'ARN viraux à 48h p.i par rapport à 24h p.i (représentée en log<sub>2</sub>). Le graphes représente la moyenne et l'ES pour 4 expériences indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*).

Des mDC ont été infectées par MOPV<sub>WT</sub>, LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub> ou un des virus chimères (MOI=1) et mises en culture avec des LT (ratio 1 :10). Après 24 ou 48h, les cellules ont été récoltées et leurs ARN extraits. Les ARN génomiques viraux ont été quantifiés par RT-qPCR (en copies/cellule). Les données présentées en figure 2.23B correspondent à l'évolution de la quantité d'ARN viraux intracellulaires entre 24 et 48h p.i (valeurs négatives si la quantité d'ARN viraux diminue, positives si elle augmente). Pour les virus MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub>, LASV<sub>GP MOPV</sub>, MOPV<sub>IGRS LASV</sub> et LASV<sub>IGRS MOPV</sub>, la quantité d'ARN viraux diminue entre 24 et 48h p.i, suggérant une absence de réplication virale. Pour LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>Z MOPV</sub> et MOPV<sub>NP LASV</sub>, la quantité d'ARN viraux augmente entre 24 et 48h p.i. Il semble donc que ces virus se répliquent dans nos cocultures. Le titre viral dans le surnageant des cocultures diminue progressivement entre 2 et 15 jours p.i, ce qui suggère que l'infection n'est pas productive (données non présentées).

**Nous avons obtenu des virus chimères de MOPV et LASV. Le ratio génomes/particules infectieuses dans les stocks viraux est assez homogène. Cependant, dans nos cocultures mDC/LT, seuls 3 virus se répliquent de manière détectable : LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>Z MOPV</sub> et MOPV<sub>NP LASV</sub>.**

### 3.4.2 Réponse des LT

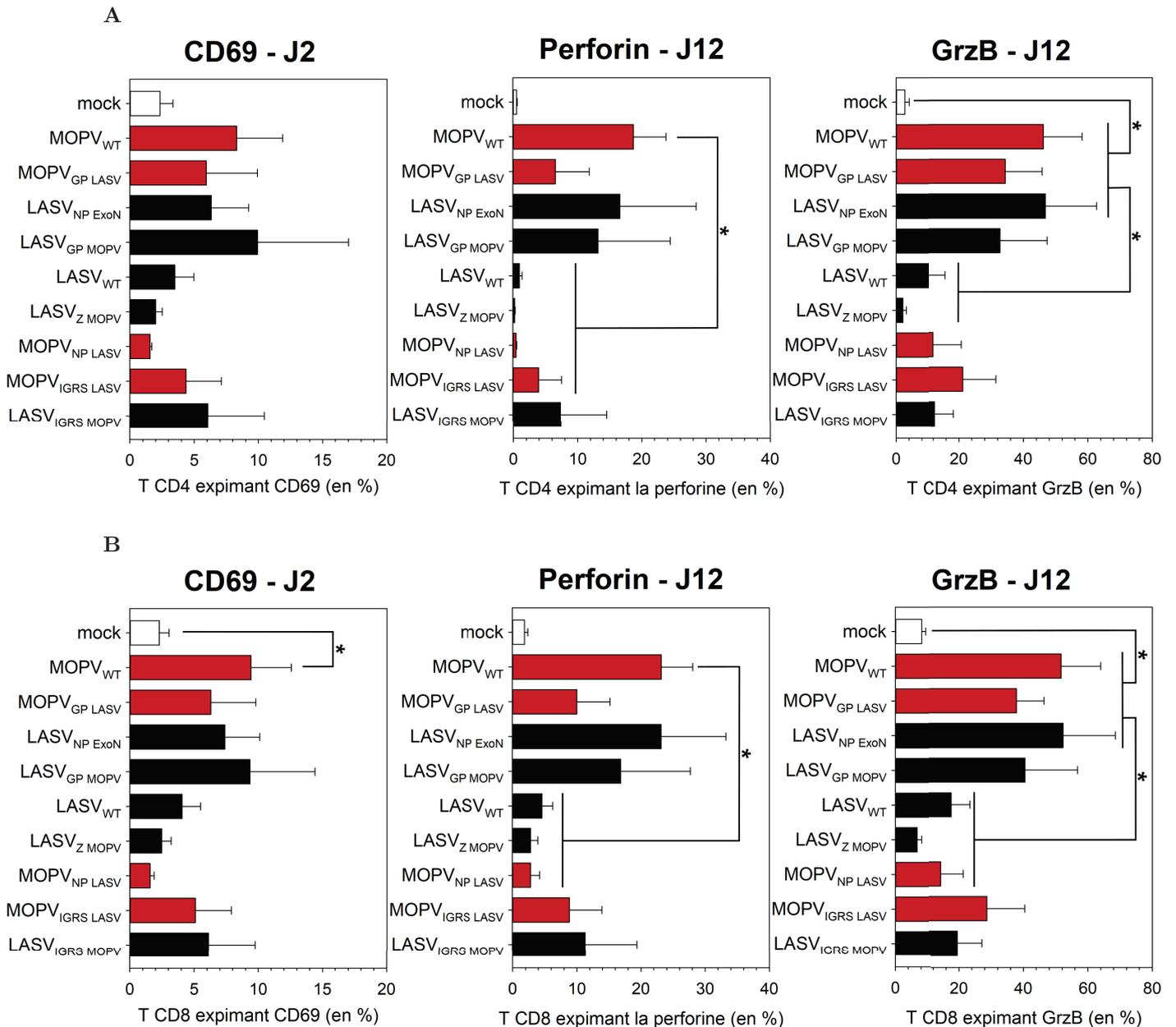
La réponse des LT en coculture a été analysée par cytométrie en flux 2 ou 12 jours p.i. Des marquages de phénotypes CD3, CD4 et CD8 nous ont permis de discriminer LT CD4, LT CD8 et NK. Le marqueur d'activation CD69 a été quantifié à J2. Les molécules cytotoxiques GrzB et perforine ont été quantifiées à J12. Les résultats sont illustrés par la figure 2.24.

D'après ces résultats, les virus peuvent être séparés en 3 groupes. Le groupe "type MOPV" comprend les virus MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub> et LASV<sub>GP MOPV</sub>. Les mDC infectées par ces virus induisent une sur-expression de CD69, GrzB et perforine par les LT CD4 (Figure 2.24A) et CD8 (Figure 2.24B). Le groupe "type LASV" comprend les virus LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>Z MOPV</sub> et MOPV<sub>NP LASV</sub>, qui sont comparables à la condition mock (pas d'activation des LT). Le dernier groupe, le groupe "intermédiaire", comprend MOPV<sub>IGRS LASV</sub> et LASV<sub>IGRS MOPV</sub>. Ces deux virus induisent en coculture une sur-expression moyenne de CD69, GrzB et perforine par les LT, supérieure à celle des virus de type LASV mais inférieure à celles des virus de type MOPV.

Il est intéressant de noter que les trois virus de type LASV sont les seuls pour lesquels nous avons observé une réplication intracellulaire entre 24 et 48h p.i. L'absence d'activation des LT par les mDC et la réplication virale sont donc corrélées.

**L'induction de la réponse T par les mDC infectées nous a permis de classer nos virus chimères dans trois groupes selon leur immunogénicité :**

type MOPV, activant fortement les LT; intermédiaire, activateur modeste des LT; et type LASV, n'activant pas les LT.



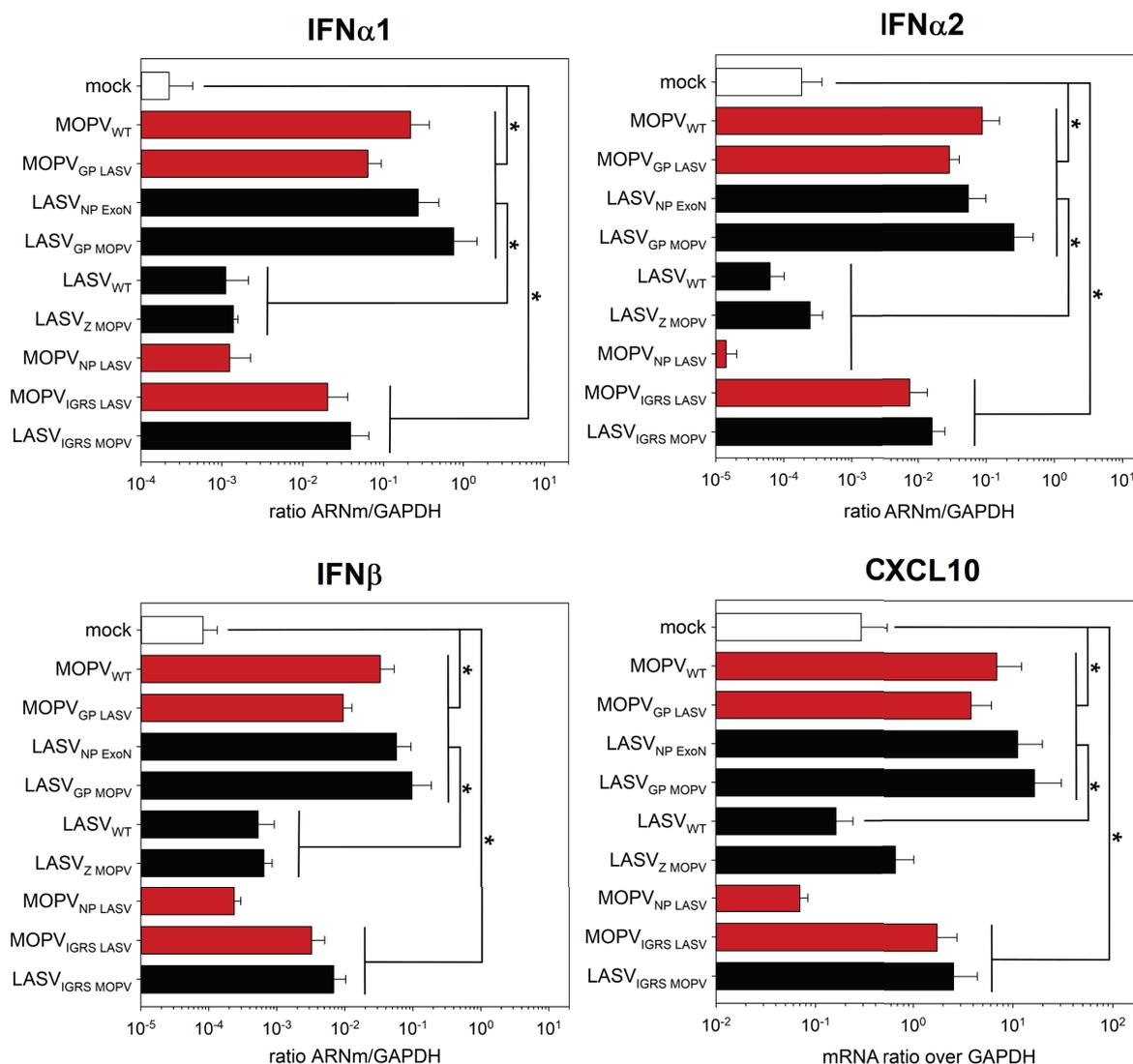
**FIGURE 2.24: Activation des LT en coculture : virus chimères**

Des mDC ont infectées par les virus chimère (MOI=1) et cultivées pendant 2 ou 12 jours avec des LT. L'activation des LT CD4 (A) et CD8 (B) a été quantifiée par cytométrie en flux. Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 4 expériences indépendantes. Les barres rouges et noires correspondent aux virus avec une base MOPV et LASV, respectivement. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*).

### 3.4.3 Réponse des mDC

Les cocultures mDC/LT infectées par MOPV<sub>WT</sub>, LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub> ou un des virus chimères (MOI=1) ont été récoltées 24h p.i. Les ARNm des gènes des IFN-I et du CXCL10 ont été quantifiés par RT-qPCR (Figure 2.25).

Pour les 4 gènes quantifiés, les profils d'expression selon les virus sont comparables. Nous retrouvons dans la réponse des mDC les trois phénotypes identifiés précédemment. L'infection des mDC en coculture par les virus de type MOPV (MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub> et LASV<sub>GP MOPV</sub>) induit une expression importante



**FIGURE 2.25: Réponse des mDC en coculture : virus chimères**

Des mDC ont été infectées par les virus chimères (MOI=1) et cultivées pendant 24h avec des LT. Les ARNm des IFN-I et de CXCL10 ont été quantifiés par RT-qPCR (ratio ARNm/GAPDH). Les graphes représentent la moyenne et l'ES pour 4 expériences indépendantes. Les barres rouges et noires correspondent aux virus avec une base MOPV et LASV, respectivement. Les différences entre les groupes ont été évaluées avec un test de Wilcoxon, et sont considérées significatives pour  $P_{value} < 0,05$  (\*).

des IFN-I et de CXCL10 (Figure 2.25). Les mDC infectées par des virus de type LASV ( $LASV_{WT}$ ,  $LASV_Z_{MOPV}$  et  $MOPV_{NP_{LASV}}$ ) sont comparables à la condition mock (pas d'induction des IFN-I ni de CXCL10). Les deux virus intermédiaires ( $MOPV_{IGRS_{LASV}}$  et  $LASV_{IGRS_{MOPV}}$ ) induisent une sur-expression moyenne des gènes IFN-I et CXCL10. L'activation des mDC en coculture correspond donc à l'activation des LT, et confirme la ségrégation des virus chimères en trois groupes.

Le phénotype des virus chimères nous donne des informations sur les propriétés immunogènes/immunosuppressives des protéines virales échangées. La Z de MOPV n'altère pas les capacités de LASV à inhiber les réponses mDC et LT en coculture. Ce phénotype suggère que la Z de MOPV n'est pas fortement immunogène, et que la Z de LASV ne porte pas de propriétés immunosuppressives majeures. Échanger les IGRS de MOPV et LASV induit un phénotype intermédiaire chez les deux virus. L'IGRS de MOPV est donc plus immunogène que celui de LASV, mais ces variations ne suffisent pas à expliquer les différences entre MOPV et LASV.  $MOPV_{GP_{LASV}}$  se comporte comme MOPV, la GP de LASV ne semble donc pas immunosuppressive. En revanche, remplacer la GP de LASV par celle de MOPV est suffisant pour que LASV devienne aussi immunogène que MOPV. Ce gain d'immunogénicité est associé à une perte de la réplication virale intracellulaire. L'effet le plus drastique a été obtenu en introduisant la NP de LASV chez MOPV.  $MOPV_{NP_{LASV}}$  se comporte comme  $LASV_{WT}$ , ce qui suggère que la NP est suffisante pour abroger complètement l'immunogénicité de MOPV. Comme  $LASV_{NP_{ExoN}}$  est très immunogène, les propriétés immunosuppressives de la NP semblent nécessiter un domaine ExN fonctionnel.

**L'induction ou la suppression de la réponse T par les virus chimères a permis leur classement selon 3 phénotypes : type MOPV, type LASV ou intermédiaire. Ces variations de phénotype donnent des indications sur les propriétés des protéines virales. Dans ce modèle de coculture mDC/T, la Z de LASV ne semble pas avoir de propriétés immunogènes ou immunosuppressives importantes. La GP de LASV n'altère pas le phénotype de MOPV, en revanche la GP de MOPV augmente significativement l'immunogénicité de LASV. La NP de LASV, en particulier son domaine ExN, est un facteur immunosuppresseur majeur.**

Les FHV posent un problème de santé publique mondial, de par leur taux de mortalité important et l'absence de moyens prophylactiques et thérapeutiques efficaces. La majorité des FHV émergent par épidémies ponctuelles, limitées dans le temps et dans l'espace. LASF a la spécificité d'être endémique, touchant chaque année plusieurs centaines de milliers de personnes en Afrique de l'ouest. Son impact humain et économique est donc particulièrement important. Une meilleure compréhension de LASF est nécessaire pour ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques. En particulier, le rôle de la réponse immunitaire lors de LASF est complexe et encore mal compris. Une réponse immune efficace est nécessaire à l'élimination du virus et donc à la survie des patients. Cependant, la réponse immune semble avoir une composante délétère dans les phases tardives de la maladie, et être à l'origine d'une grande partie des symptômes.

Dans ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la réponse des DC à LASV. Les DC jouent un rôle clef aux toutes premières phases de l'infection, car elles sont parmi les premières cibles de LASV. Elles peuvent soit avoir un rôle protecteur, en initiant la réponse immune globale, soit un rôle pro-viral, en disséminant le virus dans l'organisme. Comprendre ce qui module les contributions respectives des DC à ces rôles opposés peut améliorer la compréhension des facteurs déterminant la gravité de LASF. Parmi les DC, les pDC sont spécialisées dans la production rapide et massive d'IFN-I en réponse à un pathogène. Or, une production précoce d'IFN-I a été corrélée à la survie de PNH ou de patients infectés par LASV [10]. Les pDC pourraient être impliquées dans cette production d'IFN-I, et donc dans le contrôle de LASV. La survie à LASF a aussi été corrélée à la réponse T [164]. Les mDC sont des CPA, et ont la capacité d'initier une réponse T spécifique. Les mDC pourraient donc être essentielles au développement d'une réponse immunitaire efficace, via l'activation des LT.

Nous avons étudié la réponse des pDC et des mDC à LASV. Nous avons évalué les propriétés de l'infection de ces cellules par LASV, et leur activation suite à cette infection. Nous nous sommes aussi intéressés à la capacité des mDC infectées par LASV à activer des LT. Dans cette étude, nous avons utilisé des DC primaires humaines immatures, purifiées à partir du sang. Pour évaluer l'importance de nos résultats dans les déterminants de la forte pathogénicité de LASV, nous l'avons comparé à MOPV. MOPV est très proche de LASV, d'un point de vue phylogénique, génétique et écologique, mais il est non pathogène pour l'homme. Les facteurs, viraux et immunitaires, qui diffèrent entre ces deux virus sont donc de bons candidats pour expliquer la forte pathogénicité de LASV.

# 1 Réponse des cellules dendritiques plasmacytoïdes à LASV

**Infection** La première question à laquelle nous avons voulu répondre est l'infectabilité des pDC par MOPV et LASV. Les pDC sont réfractaires à l'infection par de nombreux virus, mais des pDC productivement infectées par LCMV ont été détectées chez la souris [121]. Comme les pDC expriment des quantités importantes d' $\alpha$ DG à leur surface, la capacité d'infecter les pDC pourrait être conservée chez d'autres Arénavirus. Nous avons pu montrer que le contact de pDC avec des virions de MOPV ou LASV n'induisait pas de production de protéines virales et de particules virales infectieuses. L'internalisation des particules virales ne semble pas non plus être importante. Les pDC ne sont donc infectables ni par MOPV ni par LASV.

*In vivo*, les pDC ne sont pas seulement en contact avec des particules virales mais aussi avec des cellules infectées. Or, il a été montré que le comportement des pDC variait selon le type de stimuli (virion/cellule infectée). Une équipe a tenté d'infecter une lignée immortalisée de pDC avec un virus LCMV portant avec la GP de LASV [91]. S'ils n'ont pas obtenu d'infection des pDC avec des particules virales, le contact entre des pDC et des cellules infectées induisait l'infection des pDC. Ainsi, avec ce modèle, les pDC sont infectables seulement au contact de cellules infectées. Nous avons testé cette hypothèse en mettant en culture des pDC primaires avec des veroE6 infectées par MOPV ou LASV. Nous avons alors pu observer des pDC présentant un signal positif pour les protéines virales, plus nombreuses avec MOPV qu'avec LASV. L'intensité du signal dans les pDC infectées étant plus faible que dans les veroE6 infectées, il semblerait que les protéines virales détectées proviennent d'une internalisation plutôt que d'une néo-synthèse. Cette augmentation des protéines virales intracellulaires pourrait être liée à la plus grande diversité des signaux produits par des cellules infectées. En effet, en plus des virions, ces cellules infectées peuvent produire des particules immatures et des exosomes contenant des composants viraux. Or la réponse des pDC à DENV est améliorée par la présence de particules immatures [48]. Dans le cas de HCV, les pDC sont activées par des exosomes contenant des ARN viraux [50]. Ainsi les cellules infectées constituent un stimulus plus complexe pour les pDC, ce qui pourrait expliquer la présence plus importante de Z de MOPV et LASV dans les pDC en coculture.

Nous avons pu détecter du virus au sein des pDC uniquement au contact de cellules infectées. Étant donnée la sensibilité des techniques utilisées, nous ne pouvons pas exclure une faible entrée virale et une réplication à bas bruit en présence de virions de MOPV et LASV. Le virus intracellulaire, qu'il provienne de l'apport initial ou d'une réplication virale, peut avoir deux conséquences antagonistes : être détecté et servir de signal activateur, ou interférer avec l'activation des pDC (de part l'activité immunosuppressive des protéines virales). Les données sur d'autres virus indiquent que la réplication virale dans les pDC n'est pas forcément nécessaire à l'initiation d'une

réponse [108, 121]. Le fait que nous n'ayons pas détecté de virus dans les pDC au contact de virions de MOPV et LASV n'implique donc pas forcément une absence de réponse.

**Réponse IFN-I** Les pDC ont des capacités importantes de production d'IFN-I en réponse à un pathogène. Or, dans la réponse globale à LASV, les IFN-I sont essentiels. Nous avons pu observer une production d'IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2 et IFN $\beta$  rapide et importante par les pDC en réponse à MOPV. MOPV est donc un bon activateur des pDC, malgré l'absence d'infection détectable. Cette réponse suggère une internalisation, avec ou sans réplication virale et probablement à bas bruit, de MOPV par les pDC. De manière surprenante, les particules virales de LASV n'induisent pas la production d'IFN-I par les pDC. Cette différence de réponse entre MOPV et LASV peut être due à l'absence de détection de LASV par les pDC ou à une immunosuppression active des pDC par le virus. Dans le second cas, cela requerrait la présence de protéines virales dans les pDC. Des différences entre MOPV et LASV dans les phases très précoces du cycle viral pourraient être impliquées. En effet, si les deux virus utilisent l' $\alpha$ DG comme récepteur d'attachement, seul LASV utilise LAMP1 comme récepteur de fusion [92]. LASV est cependant capable d'entrer en absence de LAMP1, mais de manière moins efficace et à des pH plus faibles [85]. L'utilisation d'un autre récepteur de fusion par MOPV, ou l'absence de ce second récepteur, pourrait induire un adressage de MOPV dans des compartiments cellulaires différents par rapport à LASV. La localisation des protéines et ARN viraux conditionne leur détection par la cellule, et donc l'initiation d'une réponse antivirale.

La production d'IFN-I par les pDC nécessite des stimuli différents selon les virus. Si la réponse à HIV est indépendante de la réplication virale, celle à HCV nécessite l'assemblage de virions [108, 71]. Les voies de réponses varient aussi selon les virus et les études, même si on retrouve souvent un rôle critique de TLR7, RIG-I, MyD88 et IRF7 [50, 201, 108, 96, 13]. La réponse des pDC à des cellules infectées par HIV, HCV, DENV et WNV est plus efficace qu'avec des particules virales, et la sécrétion par les cellules infectées d'exosomes contenant des ARN viraux (HCV) ou de particules immatures (DENV) joue un rôle dans cette activation [50, 48, 108]. Une différence de réponse entre particules virales et cellules infectées est envisageable pour LASV. Nous avons observé que les pDC étaient capables de contrôler l'infection de veroE6 par MOPV mais aussi par LASV, dans des proportions identiques. Ces résultats vont dans le sens d'une réponse IFN-I des pDC au contact de cellules infectées par MOPV mais aussi par LASV. Les pDC seraient donc capables de développer une réponse contre les cellules infectées par LASV, mais pas contre les virions seuls. Ces différences pourraient venir des voies d'activation des pDC. En effet, il a été montré que la détection de DENV par les pDC dépendait des RLRs pour les particules virales et de TLR7 pour les cellules infectées [26]. Comme nous avons observé des différences entre MOPV et LASV dans la détection des virions par les pDC, ces deux virus pourraient avoir des capacités différentes d'évasion/inhibition des RLRs. En revanche, si comme nous le suspectons

les pDC sont activées par des cellules infectées par LASV, LASV serait détectable via TLR7.

Ainsi les capacités de LASV à échapper à la réponse IFN-I dépendraient plutôt du contrôle des RLRs. Deux protéines virales ont été identifiées comme pouvant contrecarrer la détection par les RLRs : la NP et la Z. Si les résultats sur la NP ont été confirmés pour de nombreux Arénavirus [129], ceux sur la Z restent controversés [56, 223].

**Activation** Pour avoir une vision plus large de la réponse des pDC à MOPV et LASV, nous nous sommes intéressés à d'autres marqueurs d'activation. Par cytométrie en flux, nous n'avons pas observé de sur-expression des marqueurs d'activation en réponse à MOPV ou LASV. Les particules virales de MOPV ne semblent donc pas être un stimulus suffisant pour induire l'acquisition d'un phénotype de DC activée. Il est possible que cette activation requiert des signaux supplémentaires, qui seraient disponibles *in vivo*. Ces marqueurs d'activation pourraient jouer un rôle important dans le dialogue des pDC avec d'autres cellules du système immunitaire. Par exemple, dans les cas humains de DENV, la relocalisation de TRAIL à la membrane des pDC est corrélée à une forme modérée de la maladie [65].

Nous avons ensuite quantifié un large panel de cytokines/chémokines potentiellement sécrétées par les pDC. Contrairement à ce qui avait été observé par RT-qPCR, l'IFN $\beta$  et le TNF $\alpha$  n'ont pas été détectés dans les milieux de culture de pDC infectées par MOPV. Il est possible que ces ARNm soient régulés post-transcriptionnellement, ou simplement que le point de temps choisi (au pic de la production d'ARNm des IFN-I) ne permettent pas d'observer les protéines sécrétées. La production d'IFN $\alpha$ 2 par les pDC est augmentée par MOPV, mais aussi par LASV. Encore une fois il peut s'agir d'une régulation de la production/dégradation, ou tout simplement de différences de cinétiques. Des résultats intéressants ont été obtenus avec IL-6, IL-15 et MCP-1, qui sont produits en plus grandes quantités en réponse à LASV par rapport à MOPV. MOPV étant plus immunogène que LASV, ces résultats sont surprenants. Cependant, ces trois cytokines pro-inflammatoires ont déjà été associées à la sévérité de FHV (DENV et CCHF) et pourraient être impliquées dans la pathogenèse de LASV. Il est probable que les pDC ne soient pas les productrices majeures de ces cytokines *in vivo*, mais étant donnée leur rapidité de réponse, elles pourraient être impliquées dans l'initiation d'une réponse inflammatoire dérégulée.

Enfin, une étude transcriptomique nous a permis d'avoir une approche non biaisée de l'état des pDC en présence de MOPV ou LASV. Le plus souvent, les gènes sur-exprimés par MOPV sont sur-exprimés par LASV, mais l'amplitude de la régulation est plus importante avec MOPV. Nous avons obtenu des gènes liés à la voie JAK-STAT, illustrant l'impact autocrine et paracrine de la réponse IFN-I à MOPV. Nous avons aussi identifié des gènes des voies IL1 $\beta$ , CCL3 et prostaglandines, illustrant la plus forte immunogénicité de MOPV par rapport à LASV. Si ces gènes régulés sont peu nombreux, ils semblent avoir un impact au niveau de l'état global de la cellule : de plus nombreuses voies liées à la réponse immunitaire sont sur-exprimées en réponse

à MOPV par rapport à LASV. Ainsi, si les différences sont moins distinctes que celles observées par RT-qPCR, ces données confirment la meilleure réponse des pDC à MOPV par rapport à LASV.

**Importance** Les pDC ont des capacités importantes de production d'IFN-I en réponse à un pathogène. Ces spécificités en font des acteurs majeurs de la réponse antivirale innée, et ce malgré leur faible représentation. Chez la souris, la neutralisation des pDC affecte de manière importante la production d'IFN-I suite à un traitement au CpG [5]. Les IFN-I produits par les pDC peuvent être essentiels dans le contrôle des infections virales. Par exemple, des souris déficientes en IRF7 et donc pour lesquelles la réponse des pDC est abolie ont une susceptibilité augmentée à CHIKV [211]. Ce phénotype peut être réversé en rétablissant IRF7 spécifiquement dans les pDC. Chez les souris infectées par LCMV, les IFN-I produits par les pDC participent directement à la réduction de la charge virale [121]. Comme il a été montré chez les patients et les PNHs infectés par LASV qu'une réponse IFN-I précoce était corrélée à la survie, le rôle des pDC dans les premières phases LASF pourrait être déterminant.

Les IFN-I produits par les pDC peuvent aussi être impliqués dans l'initiation d'autres branches de la réponse immunitaire. C'est le cas lors de l'infection par LCMV chez la souris [121]. Plus globalement, les IFN-I (dont ceux produits par les pDC) sont essentiels à la mise en place de la réponse T [83]. Ainsi, outre leurs capacités antivirales directes, les IFN-I sont importants pour le développement d'une réponse adaptative. Et la réponse T est aussi essentielle au cours de LASF. À l'inverse, dans certains cas, la réponse des pDC peut aussi avoir un rôle délétère pour l'homme. La réponse des pDC à H5N1 induit l'apoptose des LT via FasL [19]. Nous avons aussi montré chez les pDC infectées par LASV la sur-expression de cytokines pouvant favoriser un contexte pro-inflammatoire délétère.

Nos données suggèrent que l'activation et la réponse IFN-I des pDC diffère entre MOPV et LASV, MOPV étant plus immunogène. Avec ce système, notre but est de modéliser *in vitro* les réponses induites dans les cas fatals et non fatals de LASF, et de caractériser leurs différences. Une activation des pDC semblable à celle induite par MOPV, aux phases très précoces de l'infection par LASV, impliquerait une réponse IFN-I antivirale efficace. Mais ces IFN-I induiraient aussi une meilleure initiation des autres branches de la réponse immunitaire, et donc une forme moins sévère de LASF. Au contraire, une réponse des pDC semblable à celle induite *in vitro* par LASV ne permettrait pas de production d'IFN-I. À cette absence de réponse s'ajouterait la production de cytokines pro-inflammatoires, menant vers une forme sévère de LASF.

## 2 Réponse des cellules dendritiques myéloïdes à LASV

**Réponse IFN-I** Les cellules dendritiques myéloïdes sont spécialisées dans la présentation antigénique. Cependant, elles sont capables de répondre directement à des pathogènes, entre autres en produisant des IFN-I. La quantité d'IFN-I produite par les mDC n'est pas aussi importante que celle produite par les pDC, mais les mDC sont bien plus nombreuses *in vivo* [5]. Ainsi, dans la réponse à LCMV, la majorité des IFN-I produits le sont par les mDC [83]. Dans ce contexte, la production d'IFN-I par les mDC est nécessaire au développement de la réponse T. La production d'IFN-I par les mDC peut donc être essentielle, de par ses propriétés antivirales mais aussi pour l'initiation d'une réponse globale.

Nous avons pu montrer que les mDC produisaient des IFN-I en réponse à MOPV. Cette réponse est plus importante que celle de moDC, qui ont été utilisées comme modèle des mDC dans des études précédentes [156]. L'infection de mDC par LASV induit une production d'IFN-I équivalente à MOPV. Ces résultats sont inattendus, car MOPV est plus immunogène que LASV dans tous les modèles connus. De plus, les moDC ne produisent pas d'IFN-I en réponse à LASV [9, 154]. Nous avons pu confirmer que cette réponse IFN-I était corrélée à une activation (sur-expression de CD40, CD80, CD86) et à une maturation (CD83) des mDC. Ces données indiquent que MOPV, mais aussi LASV, sont de bons activateurs des mDC. Elles soulignent aussi une différence entre les mDC primaires et les moDC, qui doit être prise en compte dans le choix des modèles *in vitro*.

**Infection** Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement des deux virus au contact des mDC. En effet, une infection productive des mDC pourrait avoir des conséquences sur leur réponse (meilleure détection ou immunosuppression), mais aussi sur la dissémination du virus *in vivo*. Alors que l'infection des moDC par MOPV et LASV est productive, nous n'avons pas détecté de production de virions lors de l'infection des mDC par MOPV et LASV [9]. Cette absence d'infection productive peut être expliquée par l'activation des mDC. En effet, des moDC dont la maturation a été induite avec du LPS deviennent plus réfractaires à l'infection par LASV [9]. Nous avons démontré ce lien entre activation et réplication virale avec des Ac neutralisant les effets autocrines et paracrines de la réponse IFN-I. Un traitement avec ces Ac suffit à rendre l'infection des mDC par MOPV et LASV productive. Les mDC sont donc infectables par MOPV et LASV, mais la réplication virale est inhibée très précocement par la réponse IFN-I. La différence d'infectabilité entre mDC et moDC est donc probablement imputable à la différence de réponse.

**Activation** Comme mentionné précédemment, MOPV et LASV induisent l'acquisition d'un phénotype activé par les mDC. Pour étudier plus précisément cette activation, nous avons utilisé des techniques à plus large spectre. Nous avons identifié des cytokines produites en quantités différentes par les mDC infectées par MOPV et

celles infectées par LASV. Les IFN $\alpha$ 2 sont sécrétés en plus grande quantité par les mDC infectées par MOPV. Cette différence est cohérente avec des différences non-significatives dans la transcription des ARNm IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 6 et IFN $\alpha$ 8. Nous avons aussi observé une production plus importante d'IL-6, d'IL-15, de VEGF, et de MCP-3 par les mDC en réponse à LASV par rapport à MOPV. L'IL-15 et le MCP-3 ont été associés à des contextes inflammatoires délétères pour l'hôte [159, 217]. Des niveaux importants d'IL-6 ont été détectés dans le plasma de patients et de PNH infectées par LASV, et l'IL-6 est un marqueur de sévérité dans ce modèle [132, 10]. L'IL-6 est produite en cas de dommages tissulaires, mais aussi suite à la synthèse d'autres cytokines pro-inflammatoires [190]. Elle est particulièrement importante dans le cadre de dommages hépatiques, pour lesquels l'absence d'IL-6 perturbe la régénération cellulaire [45]. Ainsi la production d'IL-6 au cours de LASF est globalement considérée comme une conséquence des dommages tissulaires, en particulier dans le foie. Cependant, l'IL-6 produite par les mDC en réponse à LASV interviendrait à des temps plus précoces, et ne serait pas juste la conséquence d'une réponse inflammatoire dérégulée. Les mDC ne sont pas nécessairement les producteurs majoritaires de ces cytokines *in vivo*, mais comme elles sont plutôt impliquées dans les phases précoces de LASF, elles pourraient jouer un rôle dans l'initiation du contexte pro-inflammatoire associé à la pathogenèse de LASF.

La transcriptomique nous a donné une image complète de l'état d'activation des mDC. L'infection par MOPV a un impact majeur sur le profil transcriptomique des mDC. LASV altère aussi ce profil transcriptomique, à travers les mêmes gènes que MOPV mais avec une amplitude moindre. De nombreux gènes régulés sont liés à la réponse immunitaire, mais nous avons aussi identifié des gènes impliqués dans les dynamiques cellulaires et le métabolisme. Ces gènes ont un effet important sur certaines voies cellulaires, en particulier des voies de la réponse immunitaire innée (PRR, RLR, PI3K). Ces voies, dont les voies de maturation des DC, sont significativement surexprimées dans les mDC infectées par MOPV comparées aux mDC infectées par LASV. Ces données confirment la plus grande immunogénicité de MOPV comparé à LASV dans notre modèle mDC.

En conclusion, LASV active les mDC, cependant cette activation semble d'intensité moindre par rapport à celle induite par MOPV. La réponse des mDC à LASV est néanmoins suffisante pour inhiber l'infection. Comme les mDC font partie des premières lignes de défense de l'organisme, les facteurs influençant la réponse des mDC peuvent avoir un impact majeur *in vivo*. Une réponse innée efficace peut tout d'abord stopper l'infection dans les phases les plus précoces. Cette réponse peut aussi limiter la réplication virale dans les mDC et donc la dissémination du virus. Enfin, l'activation des mDC est importante pour la présentation antigénique et l'initiation de la réponse adaptative. En particulier, les mDC peuvent induire une réponse T spécifique, et la réponse T est critique pour le contrôle de LASV *in vivo* [10, 202].

### 3 Initiation de la réponse T par les cellules dendritiques myéloïdes

**Activation des LT** Afin d'évaluer la capacité des mDC infectées par MOPV et LASV à activer des LT, nous avons mis au point un système de coculture. Nous nous sommes basés sur des cocultures moDC/LT mises au point précédemment au laboratoire [156]. Nous avons mis en culture des mDC infectées par MOPV et LASV avec des LT autologues. Afin d'éviter la présentation d'épitopes hétérologues aux LT par les mDC, les purifications et les cultures ont été faites en plasma autologue. Dans les cocultures MOPV, nous avons observé une activation des LT, associée à leur prolifération et l'acquisition d'un phénotype cytotoxique. Nous n'avons pas observé d'activation des LT en coculture avec des mDC infectées par LASV. Ces différences MOPV/LASV sont similaires à celles obtenues dans les cocultures moDC/T. Cependant, l'activation des LT par les moDC nécessitait des restimulations, alors qu'une seule stimulation avec des mDC est suffisante. Les mDC infectées par MOPV ont donc un meilleur potentiel d'activation des LT que les moDC.

Dans le modèle moDC/T, il a été montré que les LT activés par des moDC infectées par MOPV étaient capables de reconnaître des cellules infectées par MOPV, de les lyser et de contrôler significativement l'infection [156]. Dans le modèle mDC/T, nous avons seulement montré la production de GrzB et perforine par les LT suite à une stimulation avec des mDC infectées par MOPV. Cependant, les LT naïfs ne contiennent pas de granules cytotoxiques, la production de GrzB et perforine nécessitant l'activation du TCR et la prolifération des LT [137, 97]. Les LT en culture avec des mDC infectées par MOPV sont donc des LT cytotoxiques fonctionnels spécifiques de MOPV, et ont très probablement la capacité de lyser des cellules infectées.

Ainsi, les mDC infectées par MOPV sont très immunogènes et capables d'initier une réponse T. En revanche, les mDC infectées par LASV n'activent pas les LT. Les différences d'intensité d'activation des mDC en réponse à MOPV et LASV observées dans l'étude transcriptomique pourraient être impliquées : la réponse des mDC à LASV, bien qu'elle soit significative, peut être insuffisante pour activer les LT. Ces données correspondent aux caractéristiques des deux virus : forte immunogénicité et faible pathogénicité de MOPV, faible immunogénicité et forte pathogénicité de LASV.

**Activation des mDC** Au sein de ces cocultures, nous avons aussi analysé l'activation des mDC. La réponse des mDC à MOPV est amplifiée en coculture. Les LT induisent une augmentation de la production d'IFN $\alpha$  par les mDC d'un facteur 10. A l'opposé, les mDC infectées par LASV ne sont pas activées en coculture. Les LT ont donc un effet inhibiteur sur les mDC infectées par LASV. Les interactions mDC/LT affectent l'activation des LT mais aussi celle des mDC. Le résultat est une forte activation des mDC et des LT en présence de MOPV, et une inhibition de la réponse des mDC à LASV. Nous avons testé de nombreux médiateurs solubles pour essayer

d'identifier les mécanismes par lesquels les LT affectent les mDC. Si nous avons identifié plusieurs molécules potentiellement impliquées dans l'amplification de la réponse des mDC à MOPV (dont  $IFN\gamma$ , IL-15,  $TNF\beta$ , FasL, et TRAIL), nous n'avons pu identifier le mécanisme d'inhibition des mDC infectées par LASV.

**Rôle des protéines virales** Pour déterminer le rôle des protéines virales dans les différences entre MOPV et LASV que nous avons identifiées, nous avons généré des chimères de MOPV et LASV. Dans une base MOPV (ou LASV), nous avons échangé une des protéines avec la protéine correspondante de LASV (ou MOPV, respectivement). Nous avons aussi échangé les régions intergéniques du segment S des deux virus, et ajouté à cette étude un mutant de LASV dont le domaine ExN de la NP est non fonctionnel. L'induction de la réponse T par les mDC lors de l'infection par MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP ExoN</sub> et LASV<sub>GP MOPV</sub> sont similaires. Les virus LASV<sub>Z MOPV</sub> et MOPV<sub>NP LASV</sub> n'induisent pas d'activation des LT par les mDC, comme LASV<sub>WT</sub>. La réponse en coculture aux virus MOPV<sub>IGRS LASV</sub> et LASV<sub>IGRS MOPV</sub> est supérieure à celle de LASV mais inférieure à celle de MOPV. La ségrégation des virus dans ces trois groupes ("type MOPV", "type LASV" et "intermédiaire") ne se superpose pas à l'atténuation des virus *in vitro* (en cinétique de réplication). Aucun virus ne se réplique productivement en coculture, cependant nous avons pu détecter de la réplication virale intracellulaire pour les virus de type LASV uniquement. La réplication virale précoce est sûrement permise par un délai dans la réponse IFN-I à ces virus, puis contrôlée 2 jours p.i lorsque cette réponse est finalement établie.

L'échange des IGRS de MOPV et LASV inverse partiellement les phénotypes des virus. Une différence de structure entre les deux IGRS pourrait l'expliquer : l'IGRS de MOPV possède deux structures tige-boucle, alors que celui de LASV n'en possède qu'une seule. Une double structure étant un meilleur stimulus pour les RLR, l'IGRS de MOPV est probablement plus immunogène que celui de LASV. Cependant, comme l'échange des IGRS n'inverse que partiellement le phénotype, cette différence de détection par les RLR n'explique pas complètement la différence entre les deux virus. Nous avons aussi observé que la Z de MOPV n'impactait pas la faible immunogénicité des mDC infectées par LASV. Les propriétés immunosuppressives de la Z des Arénavirus ont fait l'objet de plusieurs publications contradictoires. L'une d'entre elle suggère que la Z des Arénavirus pathogènes, mais pas celle des Arénavirus non pathogènes, serait capable d'interagir avec RIG-I et d'inhiber sa cascade de signalisation [223]. Une autre conclut que la Z des Arénavirus du nouveau monde, mais pas celle des Arénavirus de l'ancien monde, interagirait avec RIG-I [56]. Nos résultats vont dans le sens de cette deuxième étude, l'absence de la Z de LASV n'affectant pas ses capacités immunosuppressives.

La GP de LASV ne semble pas affecter l'immunogénicité de MOPV. En revanche, la GP de MOPV inverse complètement le phénotype de LASV. Notre hypothèse est que les GP de MOPV et LASV adressent les virions vers des compartiments cellulaires

différents. Ces voies d'entrées affecteraient ensuite l'expression des protéines virales et donc l'activation/inhibition de la réponse immunitaire. Cette hypothèse est supportée par l'absence de réplication de  $LASV_{GP\ MOPV}$ , et par les différences de récepteurs secondaires des deux virus. LASV utilise LAMP1 comme récepteur de fusion, et ce n'est pas de cas de MOPV [92]. Enfin, dans notre modèle, la NP de LASV est suffisante pour abolir complètement l'immunogénicité de MOPV. Ces données confirment le rôle immunosuppressif majeur de la NP de LASV. Comme  $LASV_{NP\ ExoN}$  est aussi très immunogène, les capacités immunosuppressives de la NP semblent nécessiter un domaine ExN fonctionnel. Or, le domaine ExN de la NP de MOPV est aussi fonctionnel *in vitro* [35]. Il est possible que le domaine ExN de LASV soit plus efficace que celui de MOPV dans un contexte intracellulaire. Il est aussi possible que le domaine ExN ait une autre fonction, qui est impactée par les mutations de  $LASV_{NP\ ExoN}$ . Le domaine ExN de la NP de LCMV et de LASV est par exemple capable d'interagir avec IKK $\epsilon$ , et cette interaction pourrait être impliquée dans l'immunosuppression induite par la NP [166].

Nos données ont permis de montrer que les mDC sont capables d'initier une réponse T contre MOPV, mais pas contre LASV. La coculture avec des LT potentialise l'activation des mDC par MOPV, et inhibe l'activation des mDC par LASV. Nos résultats suggèrent que c'est la NP de LASV, et en particulier son domaine ExN, qui possède des propriétés immunosuppressive majeures. Les propriétés de la GP impactent aussi l'immunogénicité des virus, et ces différences pourraient être dues à l'adressage des virions.

## 4 Conclusion et perspectives

Nous avons utilisé pour cette étude des modèles de DC primaires purifiées, ainsi que la comparaison de deux virus très proches mais de pathogénicités radicalement différentes. Aucune étude précédente n'avait analysé la réponse à MOPV ou LASV de pDC ou mDC primaires.

Nous avons pu montrer que les pDC produisaient des quantités importantes d'IFN-I en réponse à MOPV, mais pas à LASV. Cependant, de nombreuses études ont montré que la réponse des pDC variait entre particules virales et cellules infectées. Il est donc possible que la réponse des pDC à des cellules infectées par MOPV et LASV soit différente. Les différences d'infectabilité des pDC que nous avons observées entre particules virales et cellules infectées supportent cette hypothèse. De plus, les pDC sont capables de contrôler l'infection de veroE6 infectées par MOPV et LASV, ce qui va dans le sens d'une réponse des pDC aux cellules infectées par LASV. Il serait aussi intéressant d'arriver à discriminer entre les virions internalisés par les pDC et les protéines virales néosynthétisées, afin de déterminer si le contact avec des cellules infectées rend les pDC permissives à l'infection, ou augmente leur capacité phagocytiques. La quantité de Z dans les pDC positives étant plutôt faible par rapport à des cellules permissives (veroE6), la seconde hypothèse semble plus probable.

Les mDC sont quant à elles capables de répondre à MOPV et à LASV. En revanche, seules les mDC infectées par MOPV induisent l'activation des LT. Les interactions entre mDC et LT affectent non seulement l'activation des LT mais aussi la réponse des mDC : elle est potentialisée lors de l'infection par MOPV, et inhibée lors de l'infection par LASV. Si nos données ont mis en évidence plusieurs cytokines qui peuvent être impliquées dans l'amplification de la réponse des mDC à MOPV par les LT, nous n'avons pas pu déterminer comment les LT supprimaient la réponse des mDC à LASV. Nous avons testé un large panel de molécules sécrétées potentiellement impliquées dans le dialogue entre mDC et LT, aucune n'expliquant complètement l'inhibition de la réponse des mDC par LASV. Il faudrait recourir à une approche large spectre (de type transcriptomique ou protéomique) pour identifier les facteurs impliqués. Nos données suggèrent cependant que l'interaction entre les mDC et les LT est au centre de l'immunorégulation par LASV. Non seulement les mDC infectées par LASV sont incapables d'induire une réponse T, mais cette interaction avec les LT inhibe la réponse des mDC. Dans un contexte *in vivo*, les mDC ayant rencontré un pathogène migrent vers les organes lymphoïdes où elles interagissent avec les LT. Les mécanismes physiologiques de réponse des mDC à LASV, qui impliquent une interaction avec des LT, seraient donc impliqués dans l'inhibition de cette réponse. Pour compléter cette étude, nous avons obtenu des informations intéressantes sur le rôle des facteurs viraux dans ce processus. Les virus chimères utilisés suggèrent un rôle important de la NP et de la GP, mais pas de la Z. Il semblerait donc que l'immunosuppression en coculture mDC/T nécessite la NP de LASV, en particulier son domaine ExN. La GP de LASV semble aussi nécessaire, et l'IGRS de MOPV est plus immunogène que celui de

LASV. L'immunogénicité de MOPV par rapport à LASV viendrait donc de facteurs plus immunogènes et de facteurs immunosuppresseurs moins efficaces.

Nous avons donc mis au point des modèles *ex vivo* permettant d'étudier la réponse des pDC et mDC à LASV, mais aussi la capacité des mDC à initier une réponse T spécifique. Si ces modèles sont plus complets que la plupart des modèles *in vitro*, des confirmations *in vivo* sont nécessaires. Les données obtenues chez les PNH infectés par LASV sont cohérentes avec nos résultats, mais l'infection par MOPV chez le PNH a été peu étudiée. Ces travaux n'ont pas ou peu détecté de virus chez les PNH infectés par MOPV, mais ont noté quelques dommages hépatiques et rénaux [105]. La réponse immunitaire de ces animaux n'a pas été étudiée. La comparaison MOPV/LASV est utilisée pour modéliser les différences entre les cas de LASF fatals et les cas non fatals, mais il serait intéressant de compléter ces données *in vivo* en comparant MOPV et LASV, ainsi que différentes souches de LASV. Nous pourrions alors confronter nos résultats avec ceux observés chez les PNH, et évaluer les qualités et les limites de notre modèle.

Dans l'ensemble, nos données *ex vivo* confirment encore une fois la forte immunogénicité de MOPV. L'absence de réponse à LASV semble tenir à la fois de l'immunoévasion et de l'immunosuppression. Les différences observées entre MOPV et LASV pourraient avoir un impact important *in vivo* sur l'issue de la maladie. En effet, mDC et pDC peuvent jouer un rôle critique dans les phases très précoces de la maladie. Une réponse efficace des mDC et pDC (comme observée avec MOPV *ex vivo*) permettrait un contrôle de LASV par la réponse IFN-I et l'initiation d'une réponse T efficace, deux facteurs favorables à la survie des patients. Une moins bonne réponse (comme observée avec LASV *ex vivo*) ne permettrait ni le contrôle de la réplication virale ni la mise en place d'une réponse globale, menant vers la dissémination du virus et une forme grave de LASF. Les facteurs influençant la réponse des pDC et des mDC à MOPV et LASV pourraient donc être impliqués dans les étapes précoces déterminant l'issue de LASF. Améliorer la réponse des pDC et mDC à LASV peut permettre d'améliorer le pronostic vital des patients, ce qui fait de ces cellules des cibles thérapeutiques intéressantes.

## 1 Matériel biologique

### 1.1 Cellules et virus sauvages

**veroE6** Les cellules veroE6 sont des cellules immortalisées de rein de singe vert. Elle ont été cultivées en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplémenté avec 0,5% de pénicilline/streptomycine (ATB, Invitrogen) et 5% de sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen), à 37 ° C et 5% de  $CO_2$ .

**LASV et MOPV** La souche LASV AV a été isolée chez un patient rapatrié en Allemagne [69]. La souche AN21366 de MOPV est décrite dans [222]. Les stock viraux ont été produits sur des veroE6, à 37 ° C et 5% de  $CO_2$ . Pour les cocultures mDC-LT, des stocks spécifiques de virus ont été produits en DMEM/0,5% ATB/3% pool de plasmas humains (Ppool). L'absence de mycoplasmes dans ces stocks a été confirmée, et le titre viral déterminé par immunomarquage de foyers infectieux, comme décrit ci-dessous. Toutes les expériences sur LASV ont été réalisées dans le laboratoire P4 Jean Mérieux (INSERM, Lyon).

**Titres viraux** Le milieu à titrer (stocks viraux ou surnageants de culture) a été dilué séquentiellement pour obtenir une gamme de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . Des cellules veroE6 ont été infectées avec ces dilutions et cultivées en DMEM/2% SVF/1,6% Carboxy-méthylcellulose (CMC, BDH Laboratory Supplies) pendant 6 jours. Les foyers infectieux ont été détectés par immunomarquage. Les cellules ont été incubées avec des Ac monoclonaux anti-MOPV ou LASV (L52-54-6A, L53-237-5 and YQB06-AE05, dons du Dr P. Jahrling, USAM-RIID, Fort Detrick, MD), un Ac IgG de chèvre anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline (Sigma-Aldrich) et le substrat de la phosphatase alcaline 1-Step<sup>TM</sup>NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Scientific<sup>TM</sup>). Le comptage des foyers infectieux colorés rapporté à la dilution finale a permis d'obtenir le titre viral en unité formant foyer (UFF) par mL.

### 1.2 Virus OGM

**Générique inverse** La génétique inverse de LASV et MOPV repose sur 4 plasmides : deux plasmides PRF108 codant pour le segment L et le segment S respectivement, sous promoteur Pol-I ; deux plasmides pTM1 codant pour l'ARNpol L et la

NP respectivement, sous promoteur T7 [34]. Ces quatre plasmides ont été transfectés dans des cellules BHK-T7, et les virus recombinants récoltés dans le surnageant.

Le principe de la génétique inverse est illustré par la figure 4.1. Il a été montré que l'ARNpol L et la NP sont nécessaires et suffisantes à la réplication des Arénavirus [76]. Les plasmides pTM1 codant pour ces deux protéines sont transcrits dans les cellules BHK-T7 (exprimant constitutivement l'ARNpol T7). Les ARN des segments S et L sont aussi transfectés et transcrits par la Pol-I, qui a la particularité de n'ajouter ni coiffe ni queue poly-A aux ARN. La présence dans les cellules des deux segments d'ARN viraux, de NP et de L permet d'amorcer un cycle viral complet.

Les plasmides codant pour les ARN génomiques des virus peuvent être édités afin

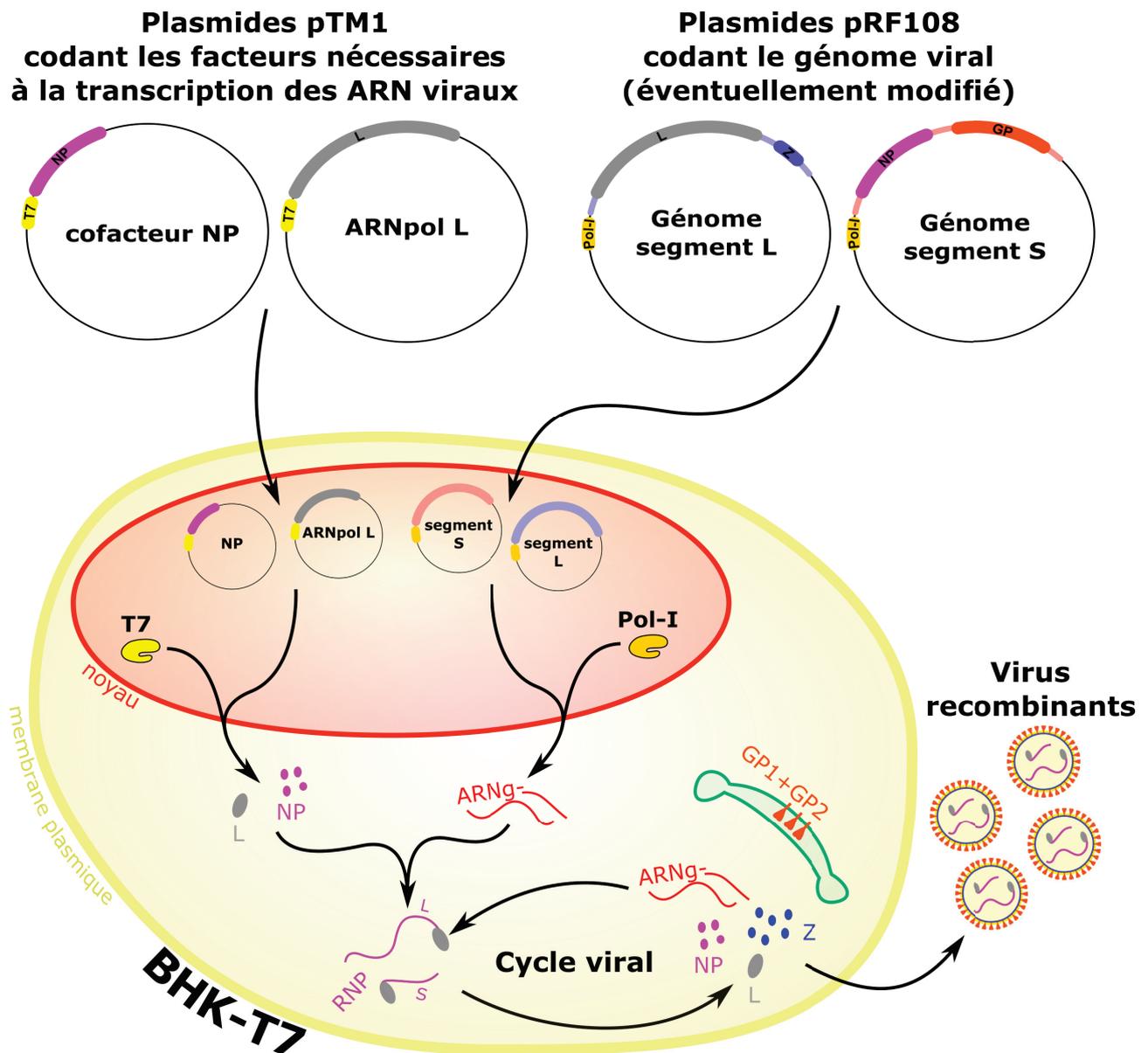


FIGURE 4.1: Schéma explicatif de la génétique inverse de LASV  
Le protocole complet est publié dans [34].

d'obtenir des virus génétiquement modifiés (OGM). Après mutation des résidus D389 et G392 dans l'ORF de la NP de LASV par des alanines (D389A et G392A), on obtient

Virus	Nom du primer	Orientation	Séquence
<b>LASV GP MOPV</b>	S-Lassa ATG GPC BsmBI-3	sens	5'-GCGCAATTCAGGCTTCTTTCACAA <b>TATGGGAG</b> <b>ACG</b> TAGTGAA-3'
	S-Lassa Stop GPC BsmBI-5	antisens	5'-GGGTACAGGGGGCTCCTGCTGGAGG <b>CCTATGA</b> <b>GACG</b> CATGAA-3'
	GPC-Mop-BsmBI-5	sens	5'-AG <b>CCGTCTC</b> <b>ATATG</b> GGGCAGATAGTCACCTTC TTCAAGAGG-3'
	GPC-Mop-BsmBI-3	antisens	5'-TG <b>CCGTCTC</b> <b>ACCTA</b> CCTTTTCCATTGTGTGGG GAGACC-3'
<b>LASV Z MOPV</b>	L-Lassa-ATG-Z-BsmBI-3	sens	5'-CCTGGGCCCATCAAC <b>ATGGAGACG</b> GACAAGC CAAAATCCAG-3'
	L-Lassa-STOP-Z-BsmBI-5	antisens	5'-GTGTGTTGGGTGG <b>GTAGGAGACG</b> TATGGCGG GGGTTGGTG-3'
	Z-Mopeia-BsmBI-5	sens	5'-AG <b>CCGTCTC</b> <b>ACATG</b> GGGAAAACGCAGTCCAAG GG-3'
	Z-Mopeia-BsmBI-3	antisens	5'-TG <b>CCGTCTC</b> <b>CCTTA</b> GGGGCTGTAGGGTGG GGG-3'
<b>LASV IGRS MOPV</b>	S-Lassa-NP-IGR BsmBI-3	sens	5'-GGCGGTGGGTCACGGGG <b>CGTCTCTT</b> ACAGG ACGACTCTTGGTGTG-3'
	S-Lassa-GPC-IGR BsmBI-5	antisens	5'-GCGGTGGGTCACGGGGGCTCCTGC <b>CGTCTCCC</b> <b>TATCTCTTCCATCTC</b> ACGGGG-3'
	Mopeia IGR BsmBI-5	sens	5'-TAG <b>CCGTCTC</b> <b>GTA</b> AAGAAGGACACCTCCAGC ACCCACCGCTCTGGC-3'
	Mopeia IGR BsmBI-3	antisens	5'-TAG <b>CCGTCTC</b> <b>GATAG</b> AGAACAGGGGACCCCC GAGACCCACCGCCG-3'
<b>MOPV GP LASV</b>	S-Mop-ATG-GPC-BsmBI-3	sens	5'-CTAGAGCATCTCG <b>AGATGGCGACG</b> TAGTCA CCTTCTTTCAAGAGG-3'
	S-Mop-STOP-GPC-BsmBI-5	antisens	5'-CGGGGTGCCCTGTTCT <b>TTACGAGACG</b> CATT GTGTGGGAGACCTGG-3'
	GPC-LAS-BsmBI-5	sens	5'-AG <b>CCGTCTC</b> <b>AGATG</b> GGGCAAATAGTGACATTC TTCAAGAGG-3'
	GPC-LAS-BsmBI-3	antisens	5'-TG <b>CCGTCTC</b> <b>CTTCA</b> TCTCTTCCATCTCACGGG GACGCC-3'
<b>MOPV NP LASV</b>	S-Mop-ATG-NP-BsmBI-3	sens	5'-GAAGGACTTCACCTCCTTT <b>CGTCTCGCATTG</b> TTGGAGCCTTTTCGG-3'
	S-Mop-STOP-NP-BsmBI-5	antisens	5'-GTTTGAACAGGTCCTCCAGAGT <b>CGTCTCGT</b> <b>AAGAAGGACACCTCC</b> ACG-3'
	NP-Las-BsmBI-5	sens	5'-AG <b>CCGTCTC</b> <b>AAATG</b> AGTGCCTCCAAAGAAGTG AAATCTTTC-3'
	NP-Las-BsmBI-3	antisens	5'-TG <b>CCGTCTC</b> <b>ACTTA</b> CAGGACGACTCTTGGTGT TGATGTTTC-3'
<b>MOPV IGRS LASV</b>	S-Mop-NP-IGR BsmBI-3	sens	5'-GGTCTCCAGAGTTGTCCT <b>GTAAGGAGACGC</b> ACCTCCAGACCCACCGCTCTGG-3'
	S-Mop-GPC-IGR BsmBI-5	antisens	5'-CGGTGGGTCTCGGGGGTGC <b>CCCGTCTCTCAC</b> CTTTCCATTGTGTGGGAGACCTGG-3'
	Lassa IGR BsmBI-5	sens	5'-TAG <b>CCGTCTC</b> <b>GTA</b> AATGACGCCCCCGTGAC CCACCGCC-3'
	Lassa IGR BsmBI-3	antisens	5'-TAG <b>CCGTCTC</b> <b>AGTGA</b> GCCTCCAGCAGGAGCC CCGTGACCC-3'

**TABLE 4.1: Table des primers utilisés dans la construction des MOPV/LASV chimériques** Les caractères en rouge indiquent les sites de restriction BsmBI introduits dans la séquence. Les caractères en verts indiquent les séquences supplémentaires de 4 acides aminés utilisées pour le clonage (stratégie Start/Stop).

par génétique inverse un virus viable nommé  $LASV_{NP\ ExoN}$ . Les mutations introduites abolissent la capacité exonucléasique de la NP.  $LASV_{NP\ ExoN}$  est décrit comme étant plus immunogène que LASV [174].

**Virus chimères** Les plasmides codant pour les segments S et L de MOPV et LASV ont été amplifiés avec des primers (décrits en table 4.1) permettant l'amplification du plasmide complet excepté un ORF ou la région IGR du segment S (IGRS). Ces primers ont aussi ajouté des sites de restriction BsmBI en amont du codon start et en aval du codon stop de l'ORF ou IGRS déplété. Après ligation, les plasmides obtenus sont les suivants : MOPV-S $\Delta$ NP, MOPV-S $\Delta$ GP, MOPV-S $\Delta$ IGRS, LASV-S $\Delta$ NP, LASV-S $\Delta$ GP, LASV-S $\Delta$ IGRS, LASV-L $\Delta$ Z. Les ORF (ou IGRS) hétérologues ont été clonés dans ces plasmides (stratégie Start/Stop). Les virus chimères ont été obtenus par génétique inverse et caractérisés sur veroE6.

Par cette technique, nous avons pu obtenir les virus chimères  $MOPV_{GP\ LASV}$ ,  $LASV_{GP\ MOPV}$ ,  $MOPV_{NP\ LASV}$ ,  $LASV_Z\ MOPV$ ,  $MOPV_{IGRS\ LASV}$  et  $LASV_{IGRS\ MOPV}$ .

**Virus fluorescents** Des virus MOPV et LASV exprimant la mCherry (MOPVmCh et LASVmCh) ont été obtenus à partir des plasmides MOPV-S $\Delta$ NP et LASV-S $\Delta$ NP. Un insert composé du gène de la mCherry et de celui de la NP (de MOPV ou de LASV) séparés par un site de clivage ribosomal P2A a été généré par PCR avec recouvrement. Cet insert a été cloné dans le plasmide MOPV-S $\Delta$ NP ou LASV-S $\Delta$ NP. Les virus ont été produits par génétique inverse et caractérisés sur veroE6. Lors de l'infection par ces virus, un ARNm codant pour la mCherry et la NP est produit. Lors de sa traduction, le polypeptide en cours de synthèse est clivé au niveau du site P2A. On obtient alors deux protéines mCherry et NP fonctionnelles. L'observation d'un signal fluorescent rouge (mCherry) indique une donc expression des protéines virales.

## 2 Culture et purification de cellules primaires

### 2.1 Purification des PBMC

Des poches de sang humain prélevé chez des donneurs sains, bénévoles et anonymes ont été fournies par l'Établissement Français du Sang (EFS). Chaque poche a été testée à posteriori par l'EFS pour HIV, HTLV, HCV, HBV et d'autres pathogènes selon les antécédents du donneur. Dans cette étude, toutes les poches utilisées étaient négatives pour ces dépistages. Chaque réplicat d'une expérience a été réalisé à partir du sang d'un don différent.

Les PBMC ont été isolées à partir du sang par centrifugation sur gradient de Ficoll (GE Healthcare). Le Ficoll a une densité inférieure à celle des érythrocytes et supérieure à celle des PBMC. Cette centrifugation permet la séparation des érythrocytes, des PBMC et du plasma. Le plasma a été récolté, décomplémenté (chauffage 30 min

à 56 ° C) et centrifugé pour éliminer les débris. Ce plasma autologue (Pauto) a ensuite été utilisé pour certaines expériences. Les PBMC ont été récoltées et lavées avec du Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)/1% Hepes/1% acides aminés non essentiels (AANE)/0,5% ATB (RPMIcomplet) supplémenté avec 5% de SVF ou 2% de Pauto (pour les cocultures mDC-LT uniquement). Environ  $10^9$  PBMC étaient obtenues à partir d'une poche de sang.

## 2.2 Purification des pDC

La purification des pDC a été réalisée à partir de PBMC en RPMIcomplet/5% SVF. Les pDC ont été isolées par déplétion suivie d'une sélection positive à l'aide du kit Diamond Plasmacytoid Dendritic Cells Isolation kit II (Miltenyi Biotec). Les cycles de purification ont été réalisés avec l'autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). Les pDC ont ensuite été comptées et mises en culture en RPMIcomplet/10% SVF. Environ  $10^6$  pDC étaient obtenues à partir d'une poche de sang, et la pureté était supérieure à 85%. Pour les tests d'infection, les pDC ont été infectées à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1. Pour la transcriptomique, les pDC ont été infectées à une MOI de 1. Pour les tests d'activation, les pDC ont été infectées à une MOI de 2 ou traitées avec du R848 (ligand TLR7 et TLR8, Invitrogen) à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (contrôle positif d'activation).

## 2.3 Purification des mDC

La purification des mDC a été réalisée à partir de PBMC en RPMIcomplet/5% SVF. Les mDC ont été isolées par déplétion à l'aide du kit Myeloid Dendritic Cells Isolation kit (Miltenyi Biotec). Les cycles de purification ont été réalisés avec l'autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec). Les mDC ont ensuite été comptées et mises en culture en RPMIcomplet/10% SVF. Environ  $10^7$  mDC étaient obtenues à partir d'une poche de sang, et la pureté était supérieure à 75%. Pour les tests d'infection, les mDC ont été infectées à une MOI de 0,1. Pour la transcriptomique, les mDC ont été infectées à une MOI de 1. Pour les tests d'activation, les mDC ont été infectées à une MOI de 2 ou traitées avec du polyI :C (pIC, Invitrogen) à 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (contrôle positif d'activation).

## 2.4 Cocultures mDC-LT

Pour les cocultures mDC-LT, la purification des mDC et des LT a été réalisée à partir de PBMC en RPMIcomplet/2% Pauto.

Les mDC ont été purifiées à partir de 75 à 80% des PBMC, d'après le protocole décrit précédemment, mais en absence de SVF. Les mDC ont ensuite été comptées et gardées sur la nuit en RPMIcomplet/10% Pauto/1mM sodium pyruvate.

20 à 25% des PBMC ont été centrifugées sur gradient de Percoll, permettant la séparation des monocytes et des lymphocytes du sang périphérique (PBL). Les PBL

ont été récoltés et lavés avec du RPMIcomplet/4% Pauto. Les lymphocytes B ont été déplétés grâce à des billes magnétiques couplées à des Ac anti-CD19 (Dyna). Le mélange de LT CD4, LT CD8 et NK ainsi obtenu a été mis en culture sur la nuit en RPMIcomplet/10% Pauto/1mM sodium pyruvate.

Le lendemain, les mDC ont été récoltées et infectées à MOI=1 pendant 1h (avec les stocks viraux produits en DMEM/0,5% ATB/3% Ppool). Pour la condition mock, les mDC ont été incubées avec un surnageant de cellules veroE6 non infectées. Les mDC infectées ont ensuite été mises en culture avec les LT à un ratio 1 mDC pour 10 LT, en RPMIcomplet/10% Pauto/1mM sodium pyruvate.

## 2.5 Neutralisation des IFN-I

**Anticorps neutralisants** Pour neutraliser la réponse IFN-I, nous avons utilisé un cocktail d'Ac neutralisants. Ce cocktail anti-IFN était composé d'Ac neutralisants anti-IFNAR (MMHAR-2 à 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-IFN $\alpha$  (MMHA-2 à 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et anti-IFN $\beta$  (MMHB-3 à 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tous de PBL Assay Science. Pour la condition contrôle, le cocktail d'Ac était composé des isotypes contrôles correspondants : IgG1 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et IgG2a (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tous de ThermoFisher<sup>TM</sup>Scientific. Une dose de cocktail d'Ac a été ajoutée à la culture cellulaire avant l'infection. Une demi dose a été ajoutée à la culture cellulaire 1 et 3 jours p.i.

**Infection** Des mDC ont été mises en culture et traitées avec les cocktails anti-IFN ou contrôle. Les cellules ont été infectées à MOI=0,1 par MOPV, LASV, MOPVmCh ou LASVmCh. Pour les mDC infectées par MOPV ou LASV, un faible volume de surnageant a été prélevé entre 0 et 6 jours p.i puis titré. Pour les mDC infectées par MOPVmCh ou LASVmCh, des images de la culture ont été prises entre 0 et 6 jours p.i. Ces images, en lumière blanche et en fluorescence rouge (excitation à 558 nm et émission à 583 nm), ont été obtenues avec un microscope Leica DMIRB.

## 3 Acides nucléiques

### 3.1 Extractions d'ARN

Pour la quantification des ARN viraux, 140  $\mu\text{L}$  de milieu (stock de virus ou surnageant de culture cellulaire) ont été extraits avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Les ARN ont été élués dans 50  $\mu\text{L}$  et conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

Pour la quantification des ARN cellulaires, les cellules ont été récoltées et centrifugées. Le culot cellulaire a été extrait avec le kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Deux traitements DNase (DNase I, QIAGEN et DNase, Ambion) ont permis d'éliminer les ADN cellulaires. Les ARN ont été élués dans 50  $\mu\text{L}$  et conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

## 3.2 Quantification des ARN viraux par RT-qPCR

**Standard ARN** Pour pouvoir quantifier de manière absolue les ARN viraux, nous avons produit des standards ARN pour les RT-qPCR MOPV et LASV.

La figure 4.2A présente le fragment de la séquence de la NP de MOPV quantifié par RT-qPCR, et les régions s'hybridant avec les primers et la sonde (en bleu). Les zones en rouge correspondent aux primers utilisés pour la production du standard. Le standard ARN correspond donc au fragment situé entre ces deux séquences (incluses). Les étapes de production du standard ARN MOPV sont schématisées dans la figure 4.2B. Les ARN d'un stock de MOPV de titre connu ont été extraits puis rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Par PCR avec les primers décrits dans la figure 4.2A

A

**NP de MOPV :**

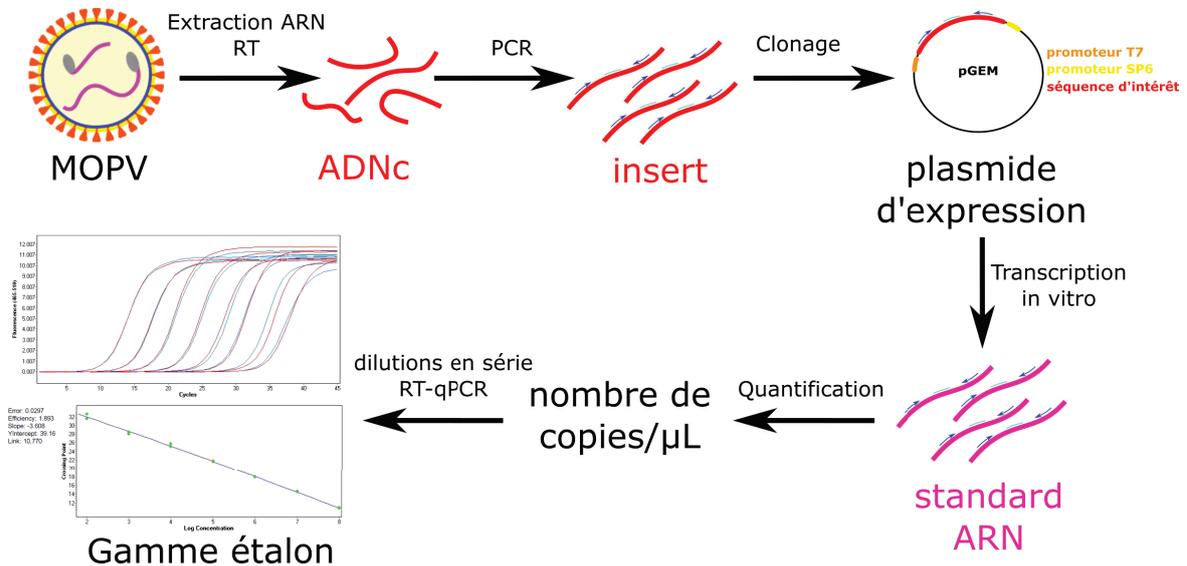
5'-AGG**CCAACCTCTCCAGAAAGACA**TAGTTTGTAGAGGAGATTTTCATAAGGGTTC**CTTTCCCTGG**  
**CGTGT**CAGAGACAAACA**TTCCCAAAGAACGTTG**ACTTT**CAAGGCAGCCTTCAA**AATTCCTTCAAAT  
**TGGATTTTGT**TACT**TTGATGGTCTCCAGCATGTTT**CCGCCGTCTAT-3'

Primers PCR

Primers RT-qPCR

Sonde RT-qPCR

B



**FIGURE 4.2: Production d'un standard ARN pour la quantification des ARN de MOPV par RT-qPCR**

A) Séquence du génome de MOPV utilisée pour la RT-qPCR et le standard ARN. Elle est située dans l'ORF de la NP. Les zones en rouge correspondent aux primers utilisés pour l'amplification de la séquence d'intérêt. Les zones en bleu correspondent aux primers et sonde utilisés pour la quantification par RT-qPCR.

B) Schéma du protocole utilisé pour produire le standard ARN.

(indiqués en rouge), fragment d'intérêt (ou insert) a été amplifié. L'insert a été cloné dans un plasmide pGEM contenant des promoteurs de transcription T7 et SP6. La transcription *in vitro* de ce plasmide en utilisant la polymérase T7 a permis d'obtenir des ARN du fragments d'intérêt. Après digestion des ADN restants, nous avons obtenu une solution pure du fragment d'ARN d'intérêt. Comme le fragment était de taille connue, le nombre de copies d'ARN par  $\mu\text{L}$  de ce standard ARN a pu être déduit de la concentration en ARN. La dilution en série du standard ARN MOPV donne une gamme étalon. En comparant les résultats d'un échantillon à cette gamme, on peut en déduire sa concentration absolue en copies d'ARN de MOPV.

Le même protocole a été utilisé pour produire un standard ARN de LASV. Ce standard correspond à la même région de la NP que celui de MOPV.

**RT-qPCR one-step** Les génomes viraux de MOPV et LASV (dans les stock de virus, des surnageant de culture cellulaire ou des ARN cellulaires) ont été quantifiés par RT-qPCR one step en SyberGreen, avec le kit EurobioGreen qPCR Mix Lo-ROX (Eurobio). Les primers utilisés ciblent le gène de la NP et sont décrits dans la table 4.2. Un LightCycler480 (Roche) a été utilisé pour la RT-qPCR en temps réel. Chaque échantillon a été passé en duplicat et avec une gamme du standard ARN MOPV ou LASV. La quantification des génomes viraux dans l'échantillon (en copies/ $\mu\text{L}$ ) a été obtenue en comparant l'échantillon avec la gamme standard.

### 3.3 Quantification des ARNm cellulaires par RT-qPCR

Les ARN cellulaires ont été rétro-transcrits en ADNc avec la transcriptase inverse SuperScript®III, les primers Oligo (dT) 12-18 et les inhibiteurs de RNase RNase OUT™ (Invitrogen). Les ADNc ont été quantifiés par qPCR avec le kit Taqman Universal master mix (Life Technologies). Pour les ARNm CD40L, CXCL10, FasL, GranzymeB, IFN $\alpha$ 6, IFN $\alpha$ 8, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-2RA IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40 IL-15, IL-18, PTGES, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , TRAIL et VSIG4, des mélanges primers/sondes commerciaux ont été utilisés (Taqman commercial primers and probes, Life Technologies). Pour les IFN-I, les primers et sondes utilisés sont décrits dans la

Cible	Primer sens	Primer antisens	Sonde
IFN $\alpha$ 1	5'-GTGGTGCTCAGCTGCAAGTC-3'	5'-TGTGGGTCTCAGGGAG ATCAC-3'	5'-AGCTGCTCTCTGGGC-3'
IFN $\alpha$ 2	5'- CAGTCTAGCAGCATCTGCAACAT-3'	5'- GGAGGGCCACCAGTA AAGC-3'	5'- ACAATGGCCTTGACCTT-3'
IFN $\beta$	5'-TCTCCACGACAGCTCTTTCCA-3'	5'-ACACTGACAATTGCTG CTTCCTTG-3'	5'-AACTTGCTTGGATTCCT-3'
NP MOPV	5'-CTTTCCCTGGCGTGTCA-3'	5'-GAATTTTGAAGGCTGCCTTGA-3'	x
NP LASV	5'-CTCTCACCCGGAGTATCT-3'	5'-CCTCAATCAATGGATGGC-3'	x

**TABLE 4.2: Primers et sondes utilisés pour la quantification des ARN viraux et des ARNm codant pour les IFN-I**

table 4.2. Les ARNm codant pour la GAPDH ont été quantifiés afin de normaliser les résultats, avec des primers et sondes commerciaux (Applied Biosystems). Chaque échantillon a été passé en duplicat sur un LightCycler480 (Roche). La quantité relative d'ARNm pour chaque gène a été calculée ainsi :

expression gène d'intérêt =  $2^{-\Delta Ct}$  avec  $\Delta Ct = Ct_{gene} - Ct_{GAPDH}$

### 3.4 Transcriptomique

**Préparation des échantillons** Des pDC ou mDC ont été infectées par LASV ou MOPV à MOI=1, ou non-infectées. Après 12h pour les pDC et 24h pour les mDC, les cellules ont été récoltées et centrifugées. Le culot cellulaire a été extrait avec le kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Deux traitements DNase (DNase I, QIAGEN et DNase, Ambion) ont permis d'éliminer les ADN cellulaires. Les ARN ont été élués dans 50  $\mu$ L et conservés à -80 ° C. La qualité et la quantité des ARN ont été mesurées avec le kit RNA 6000 nano et un Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Ces protocoles ont été répétés 3 fois sur des donneurs différents. Les ARN ont ensuite été envoyés à GATC (Constance, Allemagne) pour les mDC et à Viroscan3D (Lyon, France) pour les pDC.

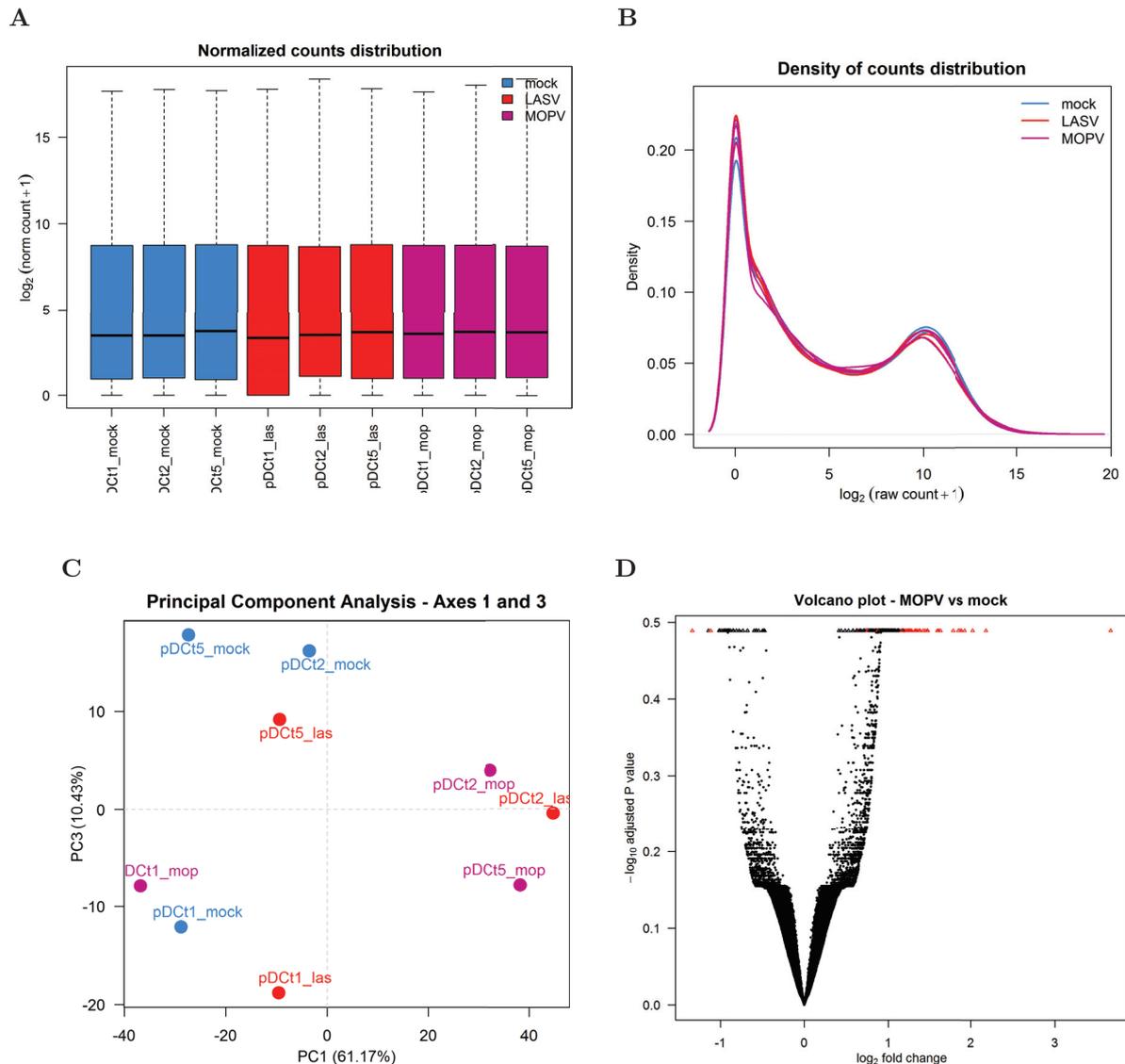
**Séquençage mDC** Pour les mDC, la préparation des bibliothèques, le séquençage et l'analyse des séquences ont été réalisés par GATC. Des ADNc ont été synthétisés par appariement aléatoire des ARN-polyA. Le séquençage illumina des ADNc était du pair-ended, avec des fragments de 2x50pb et un minimum de 30 millions de reads par échantillon. GATC a ensuite réalisé l'alignement des reads sur le génome humain, le comptage des reads correspondant à chaque gène et l'analyse statistique de ces données. Pour chaque comparaison deux à deux de nos groupes (mock/MOPV, mock/LASV et MOPV/LASV), nous avons obtenu la différence d'expression des gènes entre les deux groupes (fold change, FC) et la pertinence statistique de cette différence ( $P_{value}$ ).

**Séquençage pDC** Pour les pDC, la préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés par Viroscan3D. Nous nous sommes chargés de l'analyse bioinformatique des séquences, en collaboration avec le HUB (plateforme de bioinformatique et biostatistiques, Institut Pasteur). Des ADNc ont été synthétisés par appariement aléatoire des ARN-polyA. Le séquençage NextSeq 500 High output des ADNc était du single read, avec des fragments de 75pb et environ de 40 millions de reads par échantillon.

L'ensemble des analyses bioinformatiques ont été réalisées sur le cluster de l'Institut Pasteur. Avant de débiter l'analyse, la qualité des séquences a été vérifiée avec FastQC. Les séquences ont été alignées sur le génome humain (Human GRCh38.p7, obtenu sur ENSEMBL) avec le module STAR. Les reads correspondant à chaque gène ont ensuite été comptés avec le module Feature count. L'analyse statistique des fichiers de comptage, les contrôles qualité, le calcul des FC et des  $P_{value}$  entre les différents groupes ont été réalisés sous R avec le module SARTools. Une partie des graphes de contrôle qualité des données bioinformatiques sont présentés dans la figure 4.3.

Les graphes 4.3A et 4.3B montrent une dispersion homogène des séquences entre les échantillons, et donc leur bonne qualité. Le graphe 4.3C montre les résultats de l'analyse en composante principale des échantillons et la manière dont ils clusterisent. Le graphe 4.3D correspond uniquement à la comparaison mock/MOPV : chaque point correspond à l'expression d'un gène, avec en abscisse le FC et en ordonnée la  $P_{value}$ .

Les heatmaps d'expression des gènes ont été faites avec R. L'analyse des voies régulées a été réalisée avec Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN).



**FIGURE 4.3: Analyses statistiques des données de transcriptome**

**A-B)** Distribution des reads pour chaque échantillon. **C)** Distribution des échantillons selon leur profil transcriptomique (obtenu par analyse en composante principale). **D)** Fold change et  $P_{value}$  des comptages des gènes entre MOPV et mock (volcano plot). Les points rouges sont statistiquement significatifs ( $P_{value} < 0.05$ ) et avec un fold change suffisamment élevé ( $FC < -2$  ou  $FC > 2$ ).

## 4 Cytométrie en flux

### 4.1 Infection des pDC

Des veroE6 ont été mises en culture et infectées avec MOPV<sub>Zflag</sub> ou LASV<sub>Zflag</sub> (MOI=0,3). À 24h p.i, des pDC purifiées ont été mises en culture avec les veroE6 infectées. Les cocultures ont été gardées 24h. Comme contrôle, nous avons utilisé des veroE6 infectées (MOI=0,3) à 48h p.i et des pDC infectées (MOI=0,1) à 24h p.i. Les cellules ont été décollées avec du versène 1X (Life Technologies) et resuspendues dans un faible volume de Phosphate Buffer Saline (PBS)/5% Ppool. Les pDC ont été incubées avec un cocktail d'Ac (Table 4.4) 30 min sur glace, puis lavées avec du PBS/2,5% SVF. Les marquages intracellulaires anti-Flag ont été réalisés avec le

Cytomètre	Laser	Filtre	Fluorophores
<b>LSR Fortessa</b>	Violet (405 nm)	780/60	BV785
		695/40	BV711
		660/20	BV650
		610/20	BV605
		525/50	BV510, Khrome Orange
		450/50	Dapi, BV421, VioBlue
	Bleu (488 nm)	710/50	PerCP, PerCOP-Cy5.5
		530/30	FITC, GFP
		488/10	SSC
	Vert (561 nm)	780/60	PE-Cy7
		710/50	Pe-Cy5.5
		670/30	7AAD
		610/20	PE-Texas Red
		586/15	PE, mCherry
	Rouge (640 nm)	780/60	APC-H7, APC-Cy7
		730/45	AlexaFluor®700
		670/14	APC
	<b>Gallios</b>	Violet (405 nm)	450/40
550/40			Pacific Orange, Khrome Orange
Bleu (488 nm)		525/40	FITC
		575/30	PE
		620/30	PE-Texas Red
		695/30	PE-Cy5, PE-Cy5.5
		755LP	PE-Cy7
Rouge (638 nm)		660/20	APC
		725/20	AlexaFluor®700, APC-AlexaFluor®700
		755LP	APC-AlexaFluor®750, APC-H7

TABLE 4.3: Configuration des deux cytomètres utilisés.

kit FoxP3 Staining Buffer Set et du FcR Blocking Reagent, human (Miltenyi), selon les instructions du fabricant. Après fixation avec du paraformaldéhyde (PFA) 1%, la fluorescence des cellules a été mesurée avec un cytomètre 3 lasers Gallios (Beckman Coulter) ou un un cytomètre 4 lasers LSR Fortessa (BD Biosciences). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza (version 1.2). Le phénotypage des pDC est illustré par la figure 4.4 A. Les pDC sont définies comme Lin1<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD303<sup>+</sup>.

Localisation	Cellules	Cible	Fluorophore	Clone	Fabricant	Référence
Extracellulaire	mDC/pDC	Lin1	FITC	SK7 (CD3) 3G8 (CD16) SJ25C1 (CD19) L27 (CD20) MφP9 (CD14) NCAM16.2 (CD56)	BD Biosciences	340546
Extracellulaire	mDC/pDC	CD154	PE	TRAP1	BD Biosciences	555700
Extracellulaire	mDC/pDC	CD83	PE	HB15e	BD Biosciences	556855
Extracellulaire	mDC	CD11c	Pe-Cy5	BU15	Beckman Coulter	IM3707
Extracellulaire	mDC	CD1c	PerCP	L161	Biologend	BLE331511
Extracellulaire	mDC/pDC	CD86	Pe-Cy7	HA5.2B7	Beckman Coulter	B30648
Extracellulaire	mDC/pDC	CD274	Pe-Cy7	MIH1	BD Biosciences	558017
Extracellulaire	pDC	CD303	PE-Vio770	AC144	Miltenyi Biotech	130-096-744
Extracellulaire	mDC/pDC	CD253	APC	RIK2.1	Miltenyi Biotech	130097314
Extracellulaire	pDC	CD303	APC	AC144	Miltenyi Biotech	130090905
Extracellulaire	mDC/pDC	CD40	APC-H7	5C3	BD Biosciences	561211
Extracellulaire	mDC/pDC	CD80	APC-AlexaFluor®750	MAB104	Beckman Coulter	B30643
Extracellulaire	mDC/pDC	HLA-DR	Krome Orange	Immu-357	Beckman Coulter	B00070
Extracellulaire	mDC	CD141	VioBlue	REA674	Miltenyi Biotech	130110928
Extracellulaire	LT	CD45RA	FITC	ALB11	Beckman Coulter	A07786
Extracellulaire	LT	CD27	PE	M-T271	BD Biosciences	555441
Extracellulaire	LT	CD137	Pe-Cy5	4B4-1	BD Biosciences	551137
Extracellulaire	LT	CD4	Pe-Cy7	SFC112T4D11	Beckman Coulter	737660
Extracellulaire	LT	CD69	Pe-Cy7	FN50	BD Biosciences	560712
Extracellulaire	LT	CD4	AlexaFluor®647	RPA-T4	BD Biosciences	557707
Extracellulaire	LT	CD45RO	APC	UCHL1	BD Biosciences	559865
Extracellulaire	LT	HLA-DR	APC-H7	L243	BD Biosciences	641411
Extracellulaire	LT	CD28	APC-H7	CD28.2	BD Biosciences	561368
Extracellulaire	LT	CD3	Krome Orange	UCHT1	Beckman Coulter	B00068
Extracellulaire	LT	CD8	BV421	RPA-T8	BD Biosciences	562428
Intracellulaire	LT	Perforin	FITC	δG9	BD Biosciences	556577
Intracellulaire	LT	GrzB	PE	GB11	BD Biosciences	561142
Intracellulaire	LT	Ki67	PerCP-Cy5.5	B56	BD Biosciences	561284
Intracellulaire	pDC	Flag	APC		Miltenyi Biotech	130101564

TABLE 4.4: Anticorps utilisés pour les marquages de cytométrie en flux.

## 4.2 Activation des mDC

Les mDC ont été récoltées 24 heures p.i pour les mDC purifiées et 48 heures p.i pour les mDC en coculture avec des LT. Les cellules ont été incubées 30 min sur

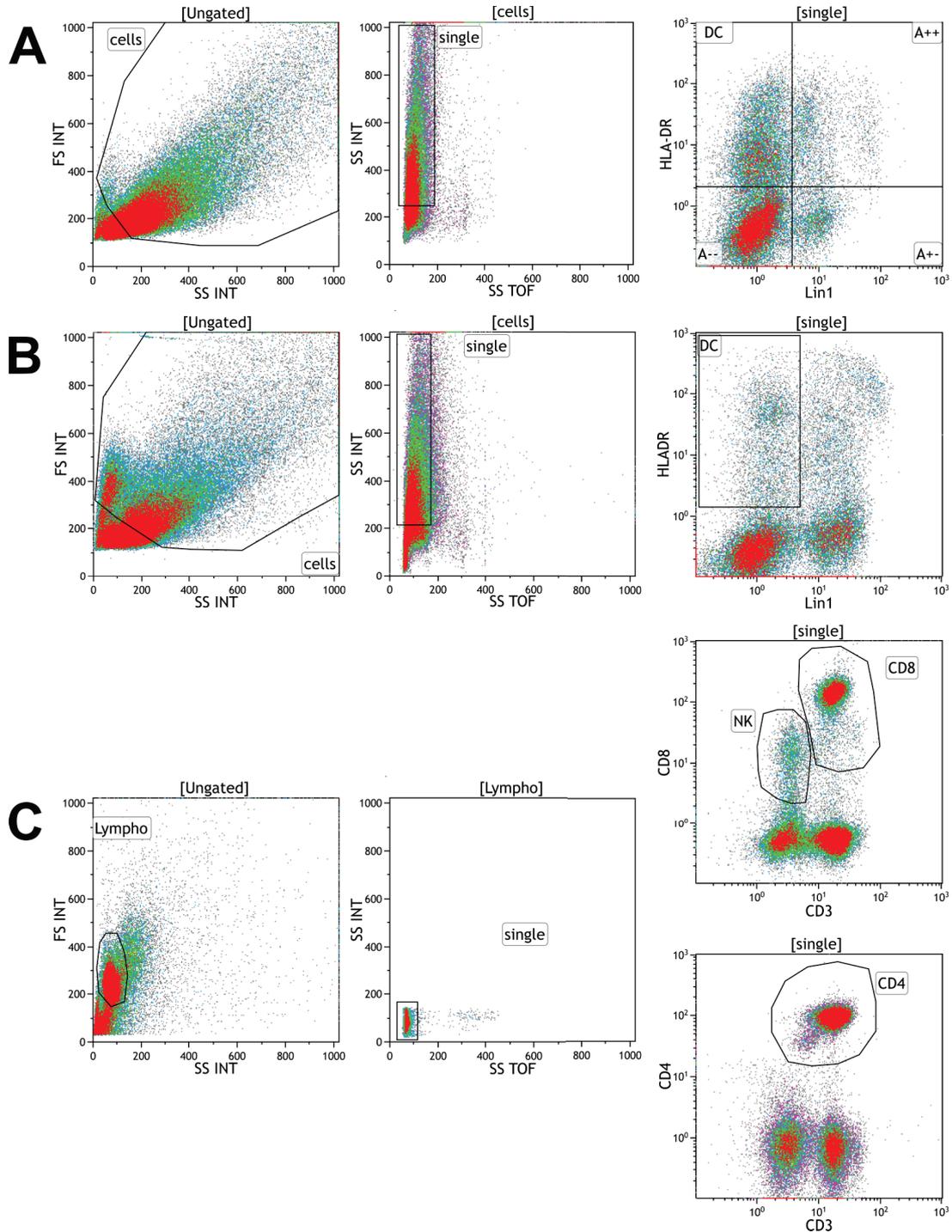


FIGURE 4.4: Gating des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux

A) mDC et pDC B) mDC en coculture avec des LT C) LT et NK en coculture avec des mDC.

glace avec un cocktail d'Ac (Table 4.4) dilué en PBS/5% Ppool. Les mDC ont été lavées avec du PBS/2,5% SVF puis fixées avec de la PFA 1%. La fluorescence des cellules a été mesurée avec un cytomètre 3 lasers Gallios (Beckman Coulter) ou un cytomètre 4 lasers LSR Fortessa (BD Biosciences). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza (version 1.2). Le phénotypage des mDC est illustré par la figure 4.4 A et B. Les mDC sont définies comme  $\text{Lin1}^-/\text{HLA-DR}^+$ . Pour confirmer le phénotype, un marquage CD11c a été réalisé. Les cellules contaminantes ( $\text{Lin1}^+$ ) représentaient moins de 25% de cellules dans toutes les expériences, et comprenaient des monocytes ( $\text{CD14}^+/\text{CD16}^+$ ), lymphocytes B ( $\text{CD20}^+$ ) et LT ( $\text{CD3}^+$ ).

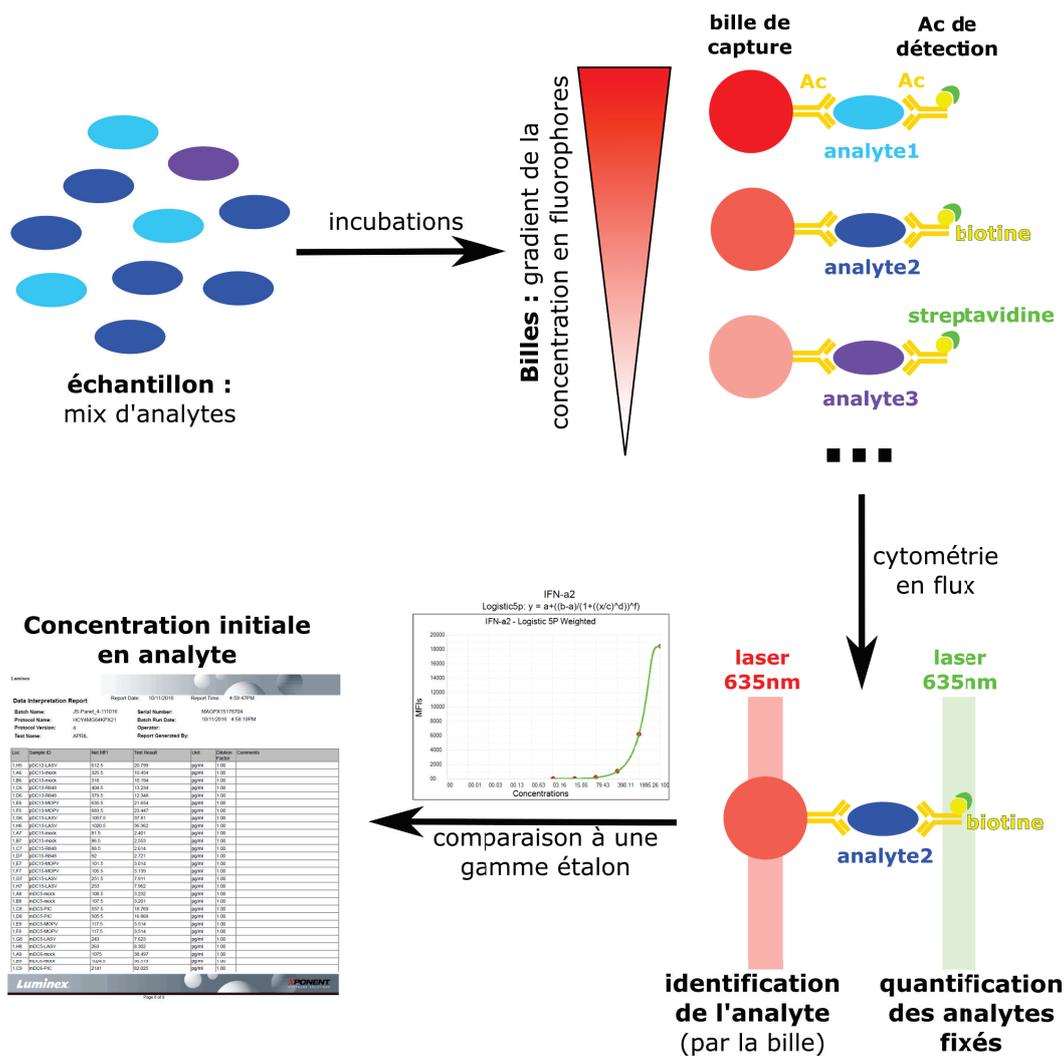
### 4.3 Activation des LT

Les LT (en coculture avec des mDC) ont été récoltés 2, 12 et 15 jours p.i. Les cellules ont été incubées 30 min sur glace avec un cocktail d'Ac (Table 4.4) dilué en PBS/5% Ppool. Les mDC ont été lavées avec du PBS/2,5% SVF, puis les marquages intracellulaires ont ensuite été réalisés avec le kit FoxP3 Staining Buffer Set et du FcR Blocking Reagent, human (Miltenyi), selon les instructions du fabricant. Après fixation avec de la PFA 1%, la fluorescence des cellules a été mesurée avec un cytomètre 3 lasers Gallios (Beckman Coulter) ou un cytomètre 4 lasers LSR Fortessa (BD Biosciences). Les résultats ont été analysés avec le logiciel Kaluza (version 1.2). Le phénotypage des LT est illustré par la figure 4.4 C. Les LT étaient sélectionnés selon leur profil FSC/SSC. Les LT CD4 et CD8 étaient définis comme  $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$  et  $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$  respectivement.

## 5 Quantification de cytokines par Luminex

**Échantillons** Les échantillons quantifiés en luminex sont des surnageants de culture de pDC ou de mDC. Pour les pDC, les cellules étaient soit infectées par MOPV ou LASV, soit traitées avec du R848, soit non infectées, et les surnageants ont été récoltés à 16h p.i. Pour les mDC, les cellules étaient soit infectées par MOPV ou LASV, soit traitées avec du pIC, soit non infectées, et les surnageants ont été récoltés à 24h p.i.

**Luminex** Les échantillons purs ont été analysés par Luminex. Le principe de cette technique est expliqué dans la figure 4.5. Les marquages ont été réalisés avec les kits Milliplex® map kit Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (PX38) et Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel IV (Merck Millipore), puis lus avec un luminex Magpix®. Au total, 50 analytes ont été quantifiés (Table 4.5).



**FIGURE 4.5: Schéma explicatif de la quantification par luminex**  
 Les échantillons sont incubés avec des billes couplées à des Ac reconnaissant un analyte (billes de capture). Les billes correspondant à un analyte ont une concentration spécifique en fluorophore qui permet leur identification par cytométrie en flux (laser rouge). Les billes sont ensuite incubées avec des Ac couplés à la biotine reconnaissant un analyte, puis avec de la streptavidine. Le luminex est un cytomètre en flux deux laser : le laser rouge permet l'identification de la bille (et donc de l'analyte) ; le laser vert permet la quantification de la streptavidine et donc des analytes. Le passage d'une gamme étalon permet la conversion fluorescence/concentration.

## 6 Graphes et statistiques

Les moyennes et les erreurs standards (ES) pour chaque ensemble de données ont été calculées avec R. Les graphes ont été réalisés avec SigmaPlot (SyStat Software Inc). Les images de microscopie ont été analysées avec AxioVision (Zeiss, version 4.9). Les schémas ont été réalisés avec InkScape (logiciel libre). Pour comparer les moyennes entre différents groupes (mock, pIC ou R848, MOPV et LASV), le test de Wilcoxon

(non paramétrique, données appareillées) a été utilisé sous R. Pour la comparaison des cinétiques de réplication, nous avons utilisé un ANOVA sur mesures répétées, suivi d'une comparaison 2 à 2 (Holm-Sidak). Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives si la  $P_{value}$  était inférieure à 0,05.

Analytes	mDC		pDC	
	dans la gamme	différences significatives	dans la gamme	différences significatives
EGF	x		x	
EotaxIn	x	x	x	
FGF-2				
Fit-3L				
Fractalkine				
G-CSF	x	x	x	
GM-CSF	x	x	x	
GRO	x	x	x	
IFN $\alpha$ 2	x	x	x	x
IFN $\gamma$	x	x	x	
IL-10	x	x	x	
IL12-p40	x	x	x	
IL12-p70	x	x	x	
IL-13				
IL-15	x	x	x	x
IL-17A				
IL-1 $\alpha$	x		x	
IL-1 $\beta$	x		x	
IL-1RA	x	x	x	
IL-2				
IL-3				
IL-4				
IL-5	x	x	x	
IL-6	x	x	x	x
IL-7				
IL-8	x	x	x	
IL-9				
IP-10	x	x	x	x
MCP-1	x	x	x	x
MCP-3	x	x	x	
MDC	x	x	x	
MIP-1 $\alpha$	x	x	x	
MIP-1 $\beta$	x	x	x	x
sCD40L	x		x	
TGF $\alpha$	x		x	
TNF $\alpha$	x	x	x	x
TNF $\beta$	x	x	x	x
VEGF	x	x	x	
MIPF-1	x		x	
BRAK				
CXCL16	x		x	
HCC-4				
MIP-4				
IL-34	x		x	
IL-24	x		x	
APRIL	x		x	
IL-35				
IL-37				
IL-19	x		x	
CCL28				
HMGB1				
IFN $\beta$	x		x	x
IL-38				
IL28B	x		x	
BAFF				
IL-14	x		x	
IL-36 $\beta$				
IL32 $\alpha$	x		x	
YKL40				
IL-2	x			

TABLE 4.5: Analytes testés en luminex

Pour les analytes grisés, la majorité des échantillons étaient en dehors de la gamme. Pour les échantillons bleus, les différences entre les conditions n'étaient pas significatives. Pour les échantillons en violet, nous avons obtenu des différences significatives.

# Bibliographie

---

- [1] M. Alcàntara-Hernández, R. Leylek, L. E. Wagar, E. G. Engleman, T. Keler, M. P. Marinkovich, M. M. Davis, G. P. Nolan, and J. Idoyaga. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity*, 0(0), dec 2017.
- [2] K. G. Andersen, B. J. Shapiro, C. B. Matranga, R. Sealfon, A. E. Lin, L. M. Moses, O. A. Folarin, A. Goba, I. Odia, P. E. Ehiane, M. Momoh, E. M. England, S. Winnicki, L. M. Branco, S. K. Gire, E. Phelan, R. Tariyal, R. Tewhey, O. Omoniwa, M. Fullah, R. Fonnies, M. Fonnies, L. Kanneh, S. Jalloh, M. Gbakie, S. Saffa, K. Karbo, A. D. Gladden, J. Qu, M. Stremlau, M. Nekoui, H. K. Finucane, S. Tabrizi, J. J. Vitti, B. Birren, M. Fitzgerald, C. McCowan, A. Ireland, A. M. Berlin, J. Bochicchio, B. Tazon-Vega, N. J. Lennon, E. M. Ryan, Z. Bjornson, D. A. Milner, A. K. Lukens, N. Broodie, M. Rowland, M. Heinrich, M. Akdag, J. S. Schieffelin, D. Levy, H. Akpan, D. G. Bausch, K. Rubins, J. B. McCormick, E. S. Lander, S. Günther, L. Hensley, S. Okogbenin, S. Viral Hemorrhagic Fever Consortium, S. F. Schaffner, P. O. Okokhere, S. H. Khan, D. S. Grant, G. O. Akpede, D. A. Asogun, A. Gnirke, J. Z. Levin, C. T. Happi, R. F. Garry, P. C. Sabeti, and P. C. Sabeti. Clinical Sequencing Uncovers Origins and Evolution of Lassa Virus. *Cell*, 162(4) :738–50, aug 2015.
- [3] K. G. Andersen, I. Shylakhter, S. Tabrizi, S. R. Grossman, C. T. Happi, and P. C. Sabeti. Genome-wide scans provide evidence for positive selection of genes implicated in Lassa fever. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1590) :868–77, mar 2012.
- [4] M. Asper, 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. *Journal of virology*, 78(6) :3162–9, mar 2004.
- [5] C. Asselin-Paturel, G. Brizard, J.-J. Pin, F. Brière, and G. Trinchieri. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *Journal of immunology*, 171(12) :6466–77, dec 2003.
- [6] D. D. Auperin, D. R. Sasso, and J. B. McCormick. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genome RNA. *Virology*, 154(1) :155–67, oct 1986.
- [7] A. Bachem, S. Güttler, E. Hartung, F. Ebstein, M. Schaefer, A. Tannert, A. Salama, K. Movassaghi, C. Opitz, H. W. Mages, V. Henn, P.-M. Kloetzel, S. Gurka, and R. A. Kroczeck. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 207(6) :1273–81, jun 2010.

- [8] F. Baharom, S. Thomas, A. Bieder, M. Hellmér, J. Volz, K. J. Sandgren, G. M. McInerney, G. B. Karlsson Hedestam, I. Mellman, and A. Smed-Sörensen. Protection of human myeloid dendritic cell subsets against influenza A virus infection is differentially regulated upon TLR stimulation. *Journal of immunology*, 194(9) :4422–30, may 2015.
- [9] S. Baize, 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. *Journal of immunology*, 172(5) :2861–9, mar 2004.
- [10] S. Baize, 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. *Journal of virology*, 83(11) :5890–903, jun 2009.
- [11] S. Baize, 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 and infection / Institut Pasteur*, 8(5) :1194–202, apr 2006.
- [12] J. Banchereau and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673) :245–252, mar 1998.
- [13] X. Bao, D. Kolli, D. Esham, T. Velayutham, and A. Casola. Human Metapneumovirus Small Hydrophobic Protein Inhibits Interferon Induction in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Viruses*, 10(6) :278, may 2018.
- [14] W. Barchet, M. Cella, and M. Colonna. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunology*, 17(4) :253–261, 2005.
- [15] L. L. Barton, M. B. Mets, and C. L. Beauchamp. Lymphocytic choriomeningitis virus : Emerging fetal teratogen. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(6) :1715–1716, dec 2002.
- [16] C. F. Basler. Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Seminars in Immunopathology*, 39(5) :551–561, jul 2017.
- [17] D. G. Bausch, P. E. Rollin, A. H. Demby, M. Coulibaly, J. Kanu, A. S. Conteh, K. D. Wagoner, L. K. McMullan, M. D. Bowen, C. J. Peters, and T. G. Ksiazek. Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. *Journal of clinical microbiology*, 38(7) :2670–7, jul 2000.
- [18] C. A. Biron, K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE : Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17(1) :189–220, apr 1999.
- [19] K. Boonnak, L. Vogel, F. Feldmann, H. Feldmann, K. L. Legge, and K. Subbarao. Lymphopenia Associated with Highly Virulent H5N1 Virus Infection Due to Plasmacytoid Dendritic Cell-Mediated Apoptosis of T Cells. *Journal of immunology*, 15(192(12)) :5906–5912, 2014.
- [20] K. L. Borden, E. J. Campbelldwyer, G. W. Carlile, M. Djavani, and M. S. Salvato. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize

- with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *Journal of virology*, 72(5) :3819–26, may 1998.
- [21] M. D. Bowen, C. J. Peters, and S. T. Nichol. Phylogenetic Analysis of the Arenaviridae : Patterns of Virus Evolution and Evidence for Cospeciation between Arenaviruses and Their Rodent Hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3) :301–316, 1997.
- [22] L. M. Branco, J. N. Grove, M. L. Boisen, J. G. Shaffer, A. Goba, M. Fullah, M. Momoh, D. S. Grant, and R. F. Garry. Emerging trends in Lassa fever : redefining the role of immunoglobulin M and inflammation in diagnosing acute infection. *Virology Journal*, 8(1) :478, oct 2011.
- [23] M. Bray. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Current Opinion in Immunology*, 17(4) :399–403, 2005.
- [24] T. Briese, J. T. Paweska, L. K. McMullan, S. K. Hutchison, C. Street, G. Palacios, M. L. Khristova, J. Weyer, R. Swanepoel, M. Egholm, S. T. Nichol, and W. I. Lipkin. Genetic Detection and Characterization of Lujo Virus, a New Hemorrhagic Fever-Associated Arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathogens*, 5(5) :e1000455, may 2009.
- [25] T. Brosh-Nissimov. Lassa fever : another threat from West Africa. *Disaster and military medicine*, 2 :8, 2016.
- [26] D. Bruni, M. Chazal, L. Sinigaglia, L. Chauveau, O. Schwartz, P. Desprès, and N. Jouvenet. Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Science signaling*, 8(366) :ra25, jan 2015.
- [27] S. M. Buckley and J. Casals. Lassa Fever, a New Virus Disease of Man from West Africa III. Isolation and Characterization of the Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19(4) :680–691, jul 1970.
- [28] D. J. Burri, G. Pasqual, C. Rochat, N. G. Seidah, A. Pasquato, and S. Kunz. Molecular characterization of the processing of arenavirus envelope glycoprotein precursors by subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease. *Journal of virology*, 86(9) :4935–46, may 2012.
- [29] I. S. Caballero, A. N. Honko, S. K. Gire, S. M. Winnicki, M. Melé, C. Gerhardinger, A. E. Lin, J. L. Rinn, P. C. Sabeti, L. E. Hensley, and J. H. Connor. In vivo Ebola virus infection leads to a strong innate response in circulating immune cells. *BMC Genomics*, 17(1) :707, dec 2016.
- [30] R. T. Callis, P. B. Jahrling, and A. DePaoli. Pathology of Lassa virus infection in the rhesus monkey. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 31(5) :1038–45, sep 1982.
- [31] W. Cao, 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*, 282(5396) :2079–81, dec 1998.
- [32] A. A. Capul, J. C. de la Torre, and M. J. Buchmeier. Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein. *Journal of virology*, 85(7) :3172–8, apr 2011.

- [33] D. E. Carey, G. E. Kemp, H. A. White, L. Pinneo, R. F. Addy, A. L. Fom, G. Stroh, J. Casals, and B. E. Henderson. Lassa fever Epidemiological aspects of the 1970 epidemic, Jos, Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(3) :402–408, 1972.
- [34] X. Carnec, S. Baize, S. Reynard, L. Diancourt, V. Caro, N. Tordo, and M. Bouloy. Lassa virus nucleoprotein mutants generated by reverse genetics induce a robust type I interferon response in human dendritic cells and macrophages. *Journal of virology*, 85(22) :12093–7, nov 2011.
- [35] X. Carnec, M. Matéo, A. Page, S. Reynard, J. Hortion, C. Picard, E. Yekwa, F. Ferron, and S. Baize. A vaccine platform against arenaviruses based on a recombinant hyper-attenuated Mopeia virus expressing heterologous glycoproteins. *Journal of virology*, mar 2018.
- [36] R. Carrion, K. Brasky, K. Mansfield, C. Johnson, M. Gonzales, A. Ticer, I. Lukashevich, S. Tardif, J. Patterson, and J. Patterson. Lassa virus infection in experimentally infected marmosets : liver pathology and immunophenotypic alterations in target tissues. *Journal of virology*, 81(12) :6482–90, jun 2007.
- [37] K. A. Cashman, E. R. Wilkinson, C. I. Shaia, P. R. Facemire, T. M. Bell, J. J. Bearss, J. D. Shamblin, S. E. Wollen, K. E. Broderick, N. Y. Sardesai, and C. S. Schmaljohn. A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 13(12) :2902–2911, dec 2017.
- [38] K. Chen, Z. Bao, W. Gong, P. Tang, T. Yoshimura, and J. M. Wang. Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family. *Journal of Autoimmunity*, 85 :64–77, dec 2017.
- [39] H. Cohen-Dvashi, N. Cohen, H. Israeli, and R. Diskin. Molecular Mechanism for LAMP1 Recognition by Lassa Virus. *Journal of virology*, 89(15) :7584–92, aug 2015.
- [40] R. Colina, M. Costa-Mattioli, R. J. O. Dowling, M. Jaramillo, L.-H. Tai, C. J. Breitbach, Y. Martineau, O. Larsson, L. Rong, Y. V. Svitkin, A. P. Makrigiannis, J. C. Bell, and N. Sonenberg. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*, 452(7185) :323, feb 2008.
- [41] M. Collin and V. Bigley. Human dendritic cell subsets : an update. *Immunology*, 154(1) :3–20, may 2018.
- [42] M. Collin, N. McGovern, and M. Haniffa. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140(1) :22–30, sep 2013.
- [43] T. I. Cornu and J. C. de la Torre. Characterization of the arenavirus RING finger Z protein regions required for Z-mediated inhibition of viral RNA synthesis. *Journal of virology*, 76(13) :6678–88, jul 2002.
- [44] S. Coutermarsh-Ott, K. Eden, and I. C. Allen. Beyond the inflammasome : regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure. *The Journal of general virology*, 97(4) :825–38, apr 2016.

- [45] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli, and R. Taub. Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice. *Science*, 274(5291) :1379–1383, 1996.
- [46] R. W. Cross, C. E. Mire, L. M. Branco, J. B. Geisbert, M. M. Rowland, M. L. Heinrich, A. Goba, M. Momoh, D. S. Grant, M. Fullah, S. H. Khan, J. E. Robinson, T. W. Geisbert, and R. F. Garry. Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antiviral research*, 133 :218–222, 2016.
- [47] D. Cummins, J. B. McCormick, D. Bennett, J. A. Samba, B. Farrar, S. J. Machin, and S. P. Fisher-Hoch. Acute Sensorineural Deafness in Lassa Fever. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 264(16) :2093, oct 1990.
- [48] E. Décembre, S. Assil, M. L. B. Hillaire, W. Dejnirattisai, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, A. D. Davidson, and M. Dreux. Sensing of Immature Particles Produced by Dengue Virus Infected Cells Induces an Antiviral Response by Plasmacytoid Dendritic Cells. *PLoS pathogens*, 10(10) :e1004434, oct 2014.
- [49] M. Djavani, I. S. Lukashevich, A. Sanchez, S. T. 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*, 235(2) :414–418, sep 1997.
- [50] M. Dreux, U. Garaigorta, B. Boyd, E. Décembre, J. Chung, C. Whitten-Bauer, S. Wieland, and F. V. Chisari. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell host and microbe*, 12(4) :558–70, oct 2012.
- [51] M. E. Droniou-Bonzom, T. Reignier, J. E. Oldenburg, A. U. Cox, C. M. Exline, J. Y. Rathbun, and P. M. Cannon. Substitutions in the glycoprotein (GP) of the Candid1 vaccine strain of Junin virus increase dependence on human transferrin receptor 1 for entry and destabilize the metastable conformation of GP. *Journal of virology*, 85(24) :13457–62, dec 2011.
- [52] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, D. W. Buck, and J. Schmitz. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4 : three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology*, 165(11) :6037–46, dec 2000.
- [53] R. Eichler, O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H.-D. Klenk, and W. Garten. Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO reports*, 4(11) :1084–8, nov 2003.
- [54] S. E. Emonet, S. Urata, and J. C. de la Torre. Arenavirus reverse genetics : new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Virology*, 411(2) :416–25, mar 2011.
- [55] D. A. Enria, A. M. Briggiler, and Z. Sánchez. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 78(1) :132–139, apr 2008.
- [56] L. Fan, T. Briese, and W. I. Lipkin. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *Journal of virology*, 84(4) :1785–91, feb 2010.

- [57] C. Fedeli, G. Torriani, C. Galan-Navarro, M.-L. Moraz, H. Moreno, G. Gerold, and S. Kunz. Axl Can Serve as Entry Factor for Lassa Virus Depending on the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *Journal of virology*, 92(5) :e01613–17, mar 2018.
- [58] S. K. Fehling, F. Lennartz, and T. Strecker. Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. *Viruses*, 4(11) :2973–3011, nov 2012.
- [59] F. Ferron, F. Weber, J. C. de la Torre, and J. Reguera. Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. *Virus Research*, 234 :118–134, apr 2017.
- [60] E. Fichet-Calvet, E. LeCompte, L. Koivogui, S. Daffis, and J. T. Meulen. Reproductive Characteristics of *Mastomys natalensis* and Lassa Virus Prevalence in Guinea, West Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(1) :41–48, feb 2008.
- [61] S. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, D. Sasso, and R. B. Craven. Hematologic dysfunction in Lassa fever. *Journal of medical virology*, 26(2) :127–35, oct 1988.
- [62] S. P. Fisher-Hoch, L. Hutwagner, B. Brown, and J. B. McCormick. Effective Vaccine for Lassa Fever. *Journal of Virology*, 74(15) :6777–6783, aug 2000.
- [63] J. D. Frame, J. M. 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 19(4) :670–6, jul 1970.
- [64] T. V. Gale, T. M. Horton, D. S. Grant, and R. F. Garry. Metabolomics analyses identify platelet activating factors and heme breakdown products as Lassa fever biomarkers. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(9) :e0005943, sep 2017.
- [65] M. Gandini, C. Gras, E. L. Azeredo, L. M. D. O. Pinto, N. Smith, P. Despres, R. V. da Cunha, L. J. de Souza, C. F. Kubelka, and J.-P. Herbeuval. Dengue virus activates membrane TRAIL relocalization and IFN- $\alpha$  production by human plasmacytoid dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6) :e2257, jun 2013.
- [66] T. W. Geisbert and P. B. Jahrling. Exotic emerging viral diseases : progress and challenges. *Nature medicine*, 10(12 Suppl) :S110–21, dec 2004.
- [67] P. Gerlach, H. Malet, S. Cusack, and J. Reguera. Structural Insights into Bunyavirus Replication and Its Regulation by the vRNA Promoter. *Cell*, 161(6) :1267–79, jun 2015.
- [68] R. Gibb, L. M. Moses, D. W. Redding, and K. E. Jones. Understanding the cryptic nature of Lassa fever in West Africa. *Pathogens and Global Health*, 111(6) :276–288, 2017.
- [69] S. Günther, 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. *Emerging infectious diseases*, 6(5) :466–76, 2000.
- [70] J. W. Golden, C. D. Hammerbeck, E. M. Mucker, and R. L. Brocato. Animal Models for the Study of Rodent-Borne Hemorrhagic Fever Viruses : Arenaviruses and Hantaviruses. *BioMed research international*, 2015 :793257, jul 2015.

- [71] E. Grabski, I. Wappler, S. Pfaender, E. Steinmann, S. Haid, A. Dzionek, T. Pietzschmann, and U. Kalinke. Efficient virus assembly, but not infectivity, determines the magnitude of hepatitis C virus-induced interferon alpha responses of plasmacytoid dendritic cells. *Journal of virology*, 89(6) :3200–8, mar 2015.
- [72] A. Groseth, T. Hoenen, M. Weber, S. Wolff, A. Herwig, A. Kaufmann, and S. Becker. Tacaribe Virus but Not Junin Virus Infection Induces Cytokine Release from Primary Human Monocytes and Macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5) :e1137, may 2011.
- [73] S. Gryseels, S. J. E. Baird, B. Borremans, R. Makundi, H. Leirs, and J. Goüy de Bellocq. When Viruses Don’t Go Viral : The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses. *PLoS pathogens*, 13(1) :e1006073, jan 2017.
- [74] M. Guillems, C.-A. Dutertre, C. L. Scott, N. McGovern, D. Sichien, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Prijck, S. J. Tavernier, I. Low, S. E. Irac, C. N. Mattar, H. R. Sumatoh, G. H. L. Low, T. J. K. Chung, D. K. H. Chan, K. K. Tan, T. L. K. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J. K. Y. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E. W. Newell, B. N. Lambrecht, B. Malissen, and F. Ginhoux. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45(3) :669–684, sep 2016.
- [75] N. Gural, L. Mancio-Silva, J. He, and S. N. Bhatia. Engineered Livers for Infectious Diseases. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 5(2) :131–144, jan 2018.
- [76] M. Hass, U. Gölnitz, S. Müller, B. Becker-Ziaja, and S. Günther. Replicon system for Lassa virus. *Journal of virology*, 78(24) :13793–803, dec 2004.
- [77] M. Hass, M. Westerkofsky, S. Müller, B. Becker-Ziaja, C. Busch, and S. Günther. Mutational analysis of the lassa virus promoter. *Journal of virology*, 80(24) :12414–9, dec 2006.
- [78] K. M. Hastie, C. R. Kimberlin, M. A. Zandonatti, I. J. MacRae, and E. O. Saphire. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3’ to 5’ exonuclease activity essential for immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6) :2396–401, feb 2011.
- [79] K. M. Hastie, L. B. King, M. A. Zandonatti, and E. O. Saphire. Structural Basis for the dsRNA Specificity of the Lassa Virus NP Exonuclease. *PLoS ONE*, 7(8) :e44211, aug 2012.
- [80] K. M. Hastie, T. Liu, S. Li, L. B. King, N. Ngo, M. A. Zandonatti, V. L. Woods, J. C. de la Torre, and E. O. Saphire. Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48) :19365–70, nov 2011.
- [81] K. M. Hastie, M. Zandonatti, T. Liu, S. Li, V. L. Woods, and E. O. Saphire. Crystal Structure of the Oligomeric Form of Lassa Virus Matrix Protein Z. *Journal of virology*, 90(9) :4556–62, may 2016.

- [82] L. E. Hensley, M. A. Smith, J. B. Geisbert, E. A. Fritz, K. M. Daddario-DiCaprio, T. Larsen, and T. W. Geisbert. Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *Virology journal*, 8(1) :205, jan 2011.
- [83] S. Hervas-Stubbs, J.-I. Riezu-Boj, U. Mancheño, P. Rueda, L. Lopez, D. Alignani, E. Rodriguez-Garcia, N. Thieblemont, and C. Leclerc. Conventional but Not Plasmacytoid Dendritic Cells Foster the Systemic Virus-Induced Type I IFN Response Needed for Efficient CD8 T Cell Priming. *Journal of immunology*, 193(3) :1151–61, jun 2014.
- [84] C. Hilpert, S. Sitte, A. Matthies, and D. Voehringer. Dendritic Cells Are Dispensable for T Cell Priming and Control of Acute Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *Journal of immunology*, 197(7) :2780–6, oct 2016.
- [85] C. E. Hulseberg, L. Fénéant, K. M. Szymanska, and J. M. White. Lamp1 Increases the Efficiency of Lassa Virus Infection by Promoting Fusion in Less Acidic Endosomal Compartments. *mBio*, 9(1) :e01818–17, jan 2018.
- [86] S. Igonet, M.-C. Vaney, C. Vonnrhein, C. Vonnrhein, G. Bricogne, E. A. Stura, H. Hengartner, B. Eschli, and F. A. Rey. X-ray structure of the arenavirus glycoprotein GP2 in its postfusion hairpin conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50) :19967–72, dec 2011.
- [87] International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, 2018.
- [88] M. Iwasaki, B. Cubitt, B. M. Sullivan, and J. C. de la Torre. The High Degree of Sequence Plasticity of the Arenavirus Noncoding Intergenic Region (IGR) Enables the Use of a Nonviral Universal Synthetic IGR To Attenuate Arenaviruses. *Journal of Virology*, 90(6) :3187–3197, mar 2016.
- [89] M. Iwasaki, P. Minder, Y. Cai, J. H. Kuhn, J. R. Yates, B. E. Torbett, and J. C. de la Torre. Interactome analysis of the lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein in infected cells reveals ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting subunit Alpha 1 and prohibitin as host-cell factors involved in the life cycle of mammarenaviruses. *PLOS Pathogens*, 14(2) :e1006892, feb 2018.
- [90] M. Iwasaki, N. Ngo, B. Cubitt, and J. C. de la Torre. Efficient Interaction between Arenavirus Nucleoprotein (NP) and RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated by the Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template. *Journal of virology*, 89(10) :5734–8, may 2015.
- [91] M. Iwasaki, S. M. Sharma, B. S. Marro, and J. C. de la Torre. Resistance of human plasmacytoid dendritic CAL-1 cells to infection with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is caused by restricted virus cell entry, which is overcome by contact of CAL-1 cells with LCMV-infected cells. *Virology*, 511 :106–113, 2017.
- [92] L. T. Jae, M. Raaben, A. S. Herbert, A. I. Kuehne, A. S. Wirchnianski, T. K. Soh, S. H. Stubbs, H. Janssen, M. Damme, P. Saftig, S. P. Whelan, J. M. Dye, and T. R. Brummelkamp. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science*, 344(6191), 2014.

- [93] P. B. Jahrling, S. Smith, R. A. Hesse, and J. B. Rhoderick. Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infection and immunity*, 37(2) :771–8, aug 1982.
- [94] V. Janovec, B. Aouar, A. Font-Haro, T. Hofman, K. Trejbalova, J. Weber, L. Chaperot, J. Plumas, D. Olive, P. Dubreuil, J. A. Nunès, R. Stranska, and I. Hirsch. The MEK1/2-ERK Pathway Inhibits Type I IFN Production in Plasmacytoid Dendritic Cells. *Frontiers in immunology*, 9 :364, 2018.
- [95] K. M. Johnson, J. B. McCormick, P. A. Webb, E. S. Smith, L. H. Elliott, and I. J. King. Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *The Journal of infectious diseases*, 155(3) :456–64, mar 1987.
- [96] A. Jung, H. Kato, Y. Kumagai, H. Kumar, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces a cytotoxic T-cell response via MyD88. *Journal of virology*, 82(1) :196–206, jan 2008.
- [97] A. Kelso, E. O. Costelloe, B. J. Johnson, P. Groves, K. Buttigieg, and D. R. Fitzpatrick. The genes for perforin, granzymes A-C and IFN-gamma are differentially expressed in single CD8(+) T cells during primary activation. *International immunology*, 14(6) :605–13, jun 2002.
- [98] M. Kiley, J. Lange, and K. Johnson. Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunisation with closely related arenavirus. *The Lancet*, 314(8145) :738, oct 1979.
- [99] B. R. King, D. Hershkowitz, P. L. Eisenhauer, M. E. Weir, C. M. Ziegler, J. Russo, E. A. Bruce, B. A. Ballif, and J. Botten. A Map of the Arenavirus Nucleoprotein-Host Protein Interactome Reveals that Junin Virus Selectively Impairs the Antiviral Activity of Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase (PKR). *Journal of virology*, 91(15), aug 2017.
- [100] J. P. Klaus, P. Eisenhauer, J. Russo, A. B. Mason, D. Do, B. King, D. Taatjes, C. Cornillez-Ty, J. E. Boyson, M. Thali, C. Zheng, L. Liao, J. R. Yates, B. Zhang, B. A. Ballif, and J. W. Botten. The intracellular cargo receptor ERGIC-53 is required for the production of infectious arenavirus, coronavirus, and filovirus particles. *Cell host and microbe*, 14(5) :522–34, nov 2013.
- [101] P. J. Kranzusch, A. D. Schenk, A. A. Rahmeh, S. R. Radoshitzky, S. Bavari, T. Walz, and S. P. J. Whelan. Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46) :20069–74, nov 2010.
- [102] P. J. Kranzusch and S. P. J. Whelan. Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49) :19743–8, dec 2011.
- [103] S. Kunz, N. Sevilla, D. B. McGavern, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone. Molecular analysis of the interaction of LCMV with its cellular receptor [alpha]-dystroglycan. *The Journal of cell biology*, 155(2) :301–10, oct 2001.
- [104] P. A. Lang, K. S. Lang, H. C. Xu, M. Grusdat, I. A. Parish, M. Recher, A. R. Elford, S. Dhanji, N. Shaabani, C. W. Tran, D. Dissanayake, R. Rahbar, M. Ghazarian, A. Brüstle, J. Fine, P. Chen, C. T. Weaver, C. Klose, A. Diefenbach, D. Häussinger,

- J. R. Carlyle, S. M. Kaech, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8<sup>+</sup> T-cell immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4) :1210–5, jan 2012.
- [105] J. V. Lange, S. W. Mitchell, B. L. Evatt, R. R. Ramsey, J. B. McCormick, and D. H. Walker. Kinetic Study of Platelets and Fibrinogen in Lassa Virus-Infected Monkeys and Early Pathologic Events in Mopeia Virus-Infected Monkeys. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34(5) :999–1007, sep 1985.
- [106] A. Lederle, B. Su, V. Holl, J. Penichon, S. Schmidt, T. Decoville, G. Laumond, and C. Moog. Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 infection of plasmacytoid dendritic cells by an FcγRIIa independent mechanism and do not diminish cytokines production. *Scientific reports*, 4 :5845, aug 2014.
- [107] E. Leifer, D. J. Gocke, and H. Bourne. Lassa Fever, a New Virus Disease of Man from West Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19(4) :677–679, jul 1970.
- [108] A. Lepelley, S. Louis, M. Sourisseau, H. K. W. Law, J. Pothlichet, C. Schilte, L. Chaperot, J. Plumas, R. E. Randall, M. Si-Tahar, F. Mammano, M. L. Albert, and O. Schwartz. Innate Sensing of HIV-Infected Cells. *PLoS Pathogens*, 7(2) :e1001284, feb 2011.
- [109] W. C. Leung and W. E. Rawls. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology*, 81(1) :174–6, aug 1977.
- [110] H. Li, D. Li, J. Sun, Y. Li, W. Yang, and Y. Li. Autoimmune regulator-overexpressing dendritic cells induce T helper 1 and T helper 17 cells by upregulating cytokine expression. *Molecular Medicine Reports*, 13(1) :565–571, jan 2015.
- [111] S. Li, Z. Sun, R. Pryce, M.-L. Parsy, S. K. Fehling, K. Schlie, C. A. Siebert, W. Garten, T. A. Bowden, T. Strecker, and J. T. Huisken. Acidic pH-Induced Conformations and LAMP1 Binding of the Lassa Virus Glycoprotein Spike. *PLOS Pathogens*, 12(2) :e1005418, feb 2016.
- [112] G. Lo Iacono, A. A. Cunningham, E. Fichet-Calvet, R. F. Garry, D. S. Grant, S. H. Khan, M. Leach, L. M. Moses, J. S. Schieffelin, J. G. Shaffer, C. T. Webb, and J. L. N. Wood. Using modelling to disentangle the relative contributions of zoonotic and anthroponotic transmission : the case of lassa fever. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1) :e3398, jan 2015.
- [113] M. E. Loureiro, A. D’Antuono, J. M. Levingston Macleod, and N. Lopez. Uncovering viral protein-protein interactions and their role in arenavirus life cycle. *Viruses*, 4(9) :1651–67, 2012.
- [114] S. ölschläger and L. Flatz. Vaccination Strategies against Highly Pathogenic Arenaviruses : The Next Steps toward Clinical Trials. *PLoS Pathogens*, 9(4) :e1003212, apr 2013.
- [115] I. S. Lukashevich. *Pathogenesis of the Old World Arenaviruses in Humans*, chapter 1. JohnWiley and Sons, Inc., first edit edition, 2015.

- [116] I. S. Lukashevich, M. Djavani, J. D. Rodas, J. C. Zapata, A. Usborne, C. Emerson, J. Mitchen, P. B. Jahrling, and M. S. Salvato. Hemorrhagic fever occurs after intravenous, but not after intragastric, inoculation of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of medical virology*, 67(2) :171–86, jun 2002.
- [117] I. S. Lukashevich, R. Maryankova, A. S. Vladyko, N. Nashkevich, S. Koleda, M. Djavani, D. Horejsh, N. N. Voitenok, and M. S. Salvato. Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells : different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *Journal of medical virology*, 59(4) :552–60, dec 1999.
- [118] I. S. Lukashevich, T. A. Stelmakh, V. P. Golubev, E. P. Stchesljenok, and N. N. Lemeshko. Ribonucleic acids of Machupo and Lassa viruses. *Archives of virology*, 79(3-4) :189–203, 1984.
- [119] I. S. Lukashevich, I. Tikhonov, J. D. Rodas, J. C. Zapata, Y. Yang, M. Djavani, and M. S. Salvato. Arenavirus-mediated liver pathology : acute lymphocytic choriomeningitis virus infection of rhesus macaques is characterized by high-level interleukin-6 expression and hepatocyte proliferation. *Journal of virology*, 77(3) :1727–37, feb 2003.
- [120] X. Ma, T. Aoki, and S. Narumiya. Prostaglandin E2-EP4 signaling persistently amplifies CD40-mediated induction of IL-23 p19 expression through canonical and non-canonical NF-kB pathways. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(2) :240–250, mar 2016.
- [121] M. Macal, G. M. Lewis, S. Kunz, R. Flavell, J. A. Harker, and E. I. Zuñiga. Plasmacytoid Dendritic Cells Are Productively Infected and Activated through TLR-7 Early after Arenavirus Infection. *Cell Host and Microbe*, 11(6) :617–630, jun 2012.
- [122] S. Mahanty, D. G. Bausch, R. L. Thomas, A. Goba, A. Bah, C. J. Peters, and P. E. Rollin. Low Levels of Interleukin-8 and Interferon-Inducible Protein-10 in Serum Are Associated with Fatal Infections in Acute Lassa Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(12) :1713–1721, jun 2001.
- [123] O. A. Makinde. As Ebola winds down, Lassa Fever reemerges yet again in West Africa. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(02) :199, feb 2016.
- [124] S. Malhotra, J. Y. Yen, A. N. Honko, S. Garamszegi, I. S. Caballero, J. C. Johnson, E. M. Mucker, J. C. Trefry, L. E. Hensley, and J. H. Connor. Transcriptional profiling of the circulating immune response to lassa virus in an aerosol model of exposure. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(4) :e2171, 2013.
- [125] J. T. Manning, N. Forrester, and S. Paessler. Lassa virus isolates from Mali and the Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Frontiers in microbiology*, 6 :1037, 2015.
- [126] J. Mariën, B. Borremans, S. Gryseels, B. Soropogui, L. De Bruyn, G. N. Bongo, B. Becker-Ziaja, J. G. de Bellocq, S. Günther, N. Magassouba, H. Leirs, and E. Fichet-Calvet. No measurable adverse effects of Lassa, Morogoro and Gairo arenaviruses on their rodent reservoir host in natural conditions. *Parasites and vectors*, 10(1) :210, apr 2017.

- [127] I.-L. Martensson, R. A. Keenan, and S. Licence. The pre-B-cell receptor. *Current Opinion in Immunology*, 19(2) :137–142, apr 2007.
- [128] M. G. Martinez, S. M. Cordo, and N. A. Candurra. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *Journal of General Virology*, 88(6) :1776–1784, jun 2007.
- [129] L. Martinez-Sobrido, P. Giannakas, B. Cubitt, A. Garcia-Sastre, and J. C. de la Torre. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *Journal of virology*, 81(22) :12696–703, nov 2007.
- [130] E. J. Mateer, C. Huang, N. Y. Shehu, and S. Paessler. Lassa fever-induced sensorineural hearing loss : A neglected public health and social burden. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(2) :e0006187, feb 2018.
- [131] T. S. M. M. Mathan, C. G. Figdor, and S. I. Buschow. Human Plasmacytoid Dendritic Cells : From Molecules to Intercellular Communication Network. *Frontiers in immunology*, 4(November) :372, jan 2013.
- [132] J. B. McCormick, K. M. Johnson, I. J. King, S. G. Whitfield, D. H. Walker, L. H. Elliott, and P. A. Webb. Lassa Virus Hepatitis : a Study of Fatal Lassa Fever in Humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35(2) :401–407, mar 1986.
- [133] J. B. McCormick, I. J. King, P. A. Webb, K. M. Johnson, R. O’Sullivan, E. S. Smith, S. Trippel, and T. C. Tong. A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *The Journal of infectious diseases*, 155(3) :445–55, mar 1987.
- [134] J. B. McCormick, P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, and E. S. Smith. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *Journal of Infectious Diseases*, 155(3) :437–44, 1987.
- [135] L. McLay, Y. Liang, and H. Ly. Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenavirus infections. *The Journal of general virology*, 95(Pt 1) :1–15, jan 2014.
- [136] F. McNab, K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O’Garra. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2) :87–103, feb 2015.
- [137] Y. Meng, H. Harlin, J. P. O’Keefe, and T. F. Gajewski. Induction of cytotoxic granules in human memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets requires cell cycle progression. *Journal of immunology*, 177(3) :1981–7, aug 2006.
- [138] B. Meyer and H. Ly. Inhibition of Innate Immune Responses Is Key to Pathogenesis by Arenaviruses. *Journal of virology*, 90(8) :3810–3818, apr 2016.
- [139] H. Müller, S. K. Fehling, S. Nakatsu, T. Noda, and T. Strecker. Lassa virus infection in human bronchial epithelial cells. In *Negative strand Virus, poster communication*, 2015.
- [140] T. P. Monath, M. Maher, J. Casals, R. E. Kissling, and A. Cacciapuoti. Lassa Fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970-1972. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23(6) :1140–1149, nov 1974.
- [141] T. P. Monath, V. F. Newhouse, G. E. Kemp, H. W. Setzer, and A. Cacciapuoti. Lassa Virus Isolation from *Mastomys natalensis* Rodents during an Epidemic in Sierra Leone. *Science*, 185(4147), 1974.

- [142] T. P. Monath, L. Pinneo, G. W. Gary, R. E. Kissling, P. E. Mertens, R. Patton, C. R. Moser\*, and J. J. Baum. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March-April 1972. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22(6) :773–779, nov 1973.
- [143] M.-L. Moraz and S. Kunz. Pathogenesis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(1) :49–59, jan 2011.
- [144] F. A. Murphy. Arenavirus taxonomy : a review. *Bulletin of the World Health Organization*, 52(4-6) :389–91, 1975.
- [145] C. T. Ng, L. M. Snell, D. G. Brooks, and M. B. A. Oldstone. Networking at the level of host immunity : immune cell interactions during persistent viral infections. *Cell host and microbe*, 13(6) :652–64, jun 2013.
- [146] L. Oestereich, A. Lüdtke, P. Ruibal, E. Pallasch, R. Kerber, T. Rieger, S. Wurr, S. Bockholt, J. V. Pérez-Giron, S. Krasemann, S. Günther, and C. Muñoz-Fontela. Chimeric Mice with Competent Hematopoietic Immunity Reproduce Key Features of Severe Lassa Fever. *PLoS pathogens*, 12(5) :e1005656, may 2016.
- [147] L. Oestereich, T. Rieger, A. Lüdtke, P. Ruibal, S. Wurr, E. Pallasch, S. Bockholt, S. Krasemann, C. Muñoz-Fontela, and S. Günther. Efficacy of Favipiravir Alone and in Combination With Ribavirin in a Lethal, Immunocompetent Mouse Model of Lassa Fever. *The Journal of infectious diseases*, 213(6) :934–8, mar 2016.
- [148] O. Ogbu, E. Ajuluchukwu, and C. J. Uneke. Lassa fever in West African sub-region : an overview. *Journal of vector borne diseases*, 44(1) :1–11, mar 2007.
- [149] P. Okokhere, A. Colubri, C. Azubike, C. Iruolagbe, O. Osazuwa, S. Tabrizi, E. Chin, S. Asad, E. Ediale, M. Rafiu, D. Adomeh, I. Odia, R. Atafo, C. Aire, S. Okogbenin, M. Pahlman, B. Becker-Ziaja, D. Asogun, T. Fradet, B. Fry, S. F. Schaffner, C. Happi, G. Akpede, S. Günther, and P. C. Sabeti. Clinical and laboratory predictors of Lassa fever outcome in a dedicated treatment facility in Nigeria : a retrospective, observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, mar 2018.
- [150] A. Olayemi, D. Cadar, N. Magassouba, A. Obadare, F. Kourouma, A. Oyeyiola, S. Fasogbon, J. Igbokwe, T. Rieger, S. Bockholt, H. Jérôme, J. Schmidt-Chanasit, M. Garrigliany, S. Lorenzen, F. Igbahenah, J.-N. Fichet, D. Ortsega, S. Omilabu, S. Günther, E. Fichet-Calvet, J. B. McCormick, S. P. Fisher-Hoch, J. D. Frame, J. M. J. Baldwin, D. J. Gocke, J. M. Troup, T. P. Monath, V. F. Newhouse, G. E. Kemp, H. W. Setzer, A. Cacciapuoti, H. Wulff, A. Fabiyi, T. P. Monath, J. B. McCormick, P. A. Webb, J. W. Krebs, K. M. Johnson, E. S. Smith, E. Lecompte, T. A. Leski, D. Safronetz, L. Kouadio, V. Nicolas, A. Olayemi, W. Wendelen, M. Colyn, S. Olschlager, M. D. Bowen, D. A. Asogun, K. G. Andersen, J. P. Gonzalez, S. Gryseels, D. Coulibaly-N’Golo, K. C. Kronmann, E. Fichet-Calvet, D. Rogers, D. U. Ehichioya, S. Gunther, L. S. Lukashevich, J. C. Clegg, K. Sidibe, E. Fichet-Calvet, B. Becker-Ziaja, L. Koivogui, S. Gunther, E. Fichet-Calvet, C. Brouat, A. Loiseau, M. Kane, K. Ba, J. M. Duplantier, N. R. Irwin, M. Bayerlova, O. Missa, N. Martinkova, C. R. Parrish, S. Vieth, H. Jiang, R. Lei, S. W. Ding, S. Zhu, B. Langmead, S. L. Salzberg, H. Li, A. McKenna, D. Darriba,

- G. L. Taboada, R. Doallo, D. Posada, I. Milne, K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, D. Martin, E. Rybicki, D. H. Huson, and D. Bryant. New Hosts of The Lassa Virus. *Scientific Reports*, 6 :25280, may 2016.
- [151] A. Olayemi, A. Obadare, A. Oyeyiola, J. Igbokwe, A. Fasogbon, F. Igbahenah, D. Ortsega, D. Asogun, P. Umeh, I. Vakkai, C. Abejegah, M. Pahlman, B. Becker-Ziaja, S. Günther, and E. Fichet-Calvet. Arenavirus Diversity and Phylogeography of *Mastomys natalensis* Rodents, Nigeria. *Emerging Infectious Diseases*, 22(4) :687–690, apr 2016.
- [152] J. Oppliger, G. Torriani, A. Herrador, and S. Kunz. Lassa Virus Cell Entry via Dystroglycan Involves an Unusual Pathway of Macropinocytosis. *Journal of virology*, 90(14) :6412–29, 2016.
- [153] E. Ortiz-Riaño, B. Y. H. Cheng, J. C. de la Torre, and L. Martinez-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. *Journal of virology*, 85(24) :13038–48, dec 2011.
- [154] D. Pannetier, C. Faure, M.-C. George-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. *Journal of Virology*, 78(19) :10516–24, 2004.
- [155] D. Pannetier, S. Reynard, M. Russier, X. Carnec, and S. Baize. Production of CXC and CC Chemokines by Human Antigen-Presenting Cells in Response to Lassa Virus or Closely Related Immunogenic Viruses, and in *Cynomolgus* Monkeys with Lassa Fever. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(1) :e2637, 2014.
- [156] D. Pannetier, S. Reynard, M. Russier, A. Journeaux, N. Tordo, V. Deubel, and S. Baize. Human dendritic cells infected with the nonpathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than those infected with Lassa virus. *Journal of virology*, 85(16) :8293–306, aug 2011.
- [157] A. Papa, K. Tsergouli, D. Y. çağlayık, S. Bino, N. Como, Y. Uyar, and G. Korukluoglu. Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Journal of Medical Virology*, 88(1) :21–27, jan 2016.
- [158] G. Pasqual, J. M. Rojek, M. Masin, J.-Y. 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 Pathogens*, 7(9) :e1002232, sep 2011.
- [159] M. Patidar, N. Yadav, and S. K. Dalai. Interleukin 15 : A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 31 :49–59, oct 2016.
- [160] F. Paul, Y. Arkin, A. Giladi, D. A. Jaitin, E. Kenigsberg, H. Keren-Shaul, D. Winter, D. Lara-Astiaso, M. Gury, A. Weiner, E. David, N. Cohen, F. K. B. Lauridsen, S. Haas, A. Schlitzer, A. Mildner, F. Ginhoux, S. Jung, A. Trumpp, B. T. Porse, A. Tannay, and I. Amit. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*, 163(7) :1663–1677, dec 2015.

- [161] M. Perez, D. L. Greenwald, and J. C. de la Torre. Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *Journal of virology*, 78(20) :11443–8, oct 2004.
- [162] D. D. Pinschewer, M. Perez, and J. C. de la Torre. Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *Journal of virology*, 79(7) :4519–26, apr 2005.
- [163] C. Pontremoli, D. Forni, R. Cagliani, U. Pozzoli, S. Riva, I. G. Bravo, M. Clerici, and M. Sironi. Evolutionary analysis of Old World arenaviruses reveals a major adaptive contribution of the viral polymerase. *Molecular Ecology*, 26(19) :5173–5188, oct 2017.
- [164] J. B. Prescott, A. Marzi, D. Safronetz, S. J. Robertson, H. Feldmann, and S. M. Best. Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nature Reviews Immunology*, 17(3) :195–207, jan 2017.
- [165] M. E. Price, S. P. Fisher-Hoch, R. B. Craven, and J. B. McCormick. A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ (Clinical research ed.)*, 297(6648) :584–7, sep 1988.
- [166] C. Pythoud, W. W. S. I. Rodrigo, G. Pasqual, S. Rothenberger, L. Martinez-Sobrido, J. C. de la Torre, and S. Kunz. Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKe. *Journal of virology*, 86(15) :7728–38, aug 2012.
- [167] X. Qi, S. Lan, W. Wang, L. M. Schelde, H. Dong, G. D. Wallat, H. Ly, Y. Liang, and C. Dong. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature*, 468(7325) :779–783, dec 2010.
- [168] V. Raabe and J. Koehler. Laboratory Diagnosis of Lassa Fever. *Journal of clinical microbiology*, 55(6) :1629–1637, jun 2017.
- [169] M. Raaben, L. T. Jae, A. S. Herbert, A. I. Kuehne, S. H. Stubbs, Y.-Y. Chou, V. A. Blomen, T. Kirchhausen, J. M. Dye, T. R. Brummelkamp, and S. P. Whelan. NRP2 and CD63 Are Host Factors for Lujjo Virus Cell Entry. *Cell host and microbe*, 22(5) :688–696.e5, nov 2017.
- [170] S. R. Radoshitzky, J. Abraham, C. F. Spiropoulou, J. H. Kuhn, D. Nguyen, W. Li, J. Nagel, P. J. Schmidt, J. H. Nunberg, N. C. Andrews, M. Farzan, and H. Choe. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*, 446(7131) :92–96, mar 2007.
- [171] S. R. Radoshitzky, Y. Bao, M. J. Buchmeier, R. N. Charrel, A. N. Clawson, C. S. Clegg, J. L. DeRisi, S. Emonet, J.-P. Gonzalez, J. H. Kuhn, I. S. Lukashevich, C. J. Peters, V. Romanowski, M. S. Salvato, M. D. Stenglein, and J. C. de la Torre. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Archives of Virology*, 160(7) :1851–1874, jul 2015.
- [172] N. Raftery and N. J. Stevenson. Advances in anti-viral immune defence : revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway, jul 2017.
- [173] J. Reguera, P. Gerlach, M. Rosenthal, S. Gaudon, F. Coscia, S. Günther, and S. Cusack. Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases. *PLOS Pathogens*, 12(6) :e1005636, jun 2016.

- [174] S. Reynard, M. Russier, A. Fizet, X. Carnec, and S. Baize. Exonuclease domain of the Lassa virus nucleoprotein is critical to avoid RIG-I signaling and to inhibit the innate immune response. *Journal of virology*, 88(23) :13923–7, dec 2014.
- [175] T. Rieger, D. Merkler, and S. Günther. Infection of type I interferon receptor-deficient mice with various old world arenaviruses : a model for studying virulence and host species barriers. *PloS one*, 8(8) :e72290, jan 2013.
- [176] J. D. Rodas, C. Cairo, M. Djavani, J. C. Zapata, T. Ruckwardt, J. Bryant, C. D. Pauza, I. S. Lukashevich, and M. S. Salvato. Circulating natural killer and gammadelta T cells decrease soon after infection of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4) :583–91, jul 2009.
- [177] J. M. Rojek, M.-L. Moraz, C. Pythoud, S. Rothenberger, F. G. Van der Goot, K. P. Campbell, and S. Kunz. Binding of Lassa virus perturbs extracellular matrix-induced signal transduction via dystroglycan. *Cellular Microbiology*, 14(7) :1122–1134, jul 2012.
- [178] J. M. Rojek, C. F. Spiropoulou, K. P. 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. *Journal of virology*, 81(11) :5685–95, jun 2007.
- [179] N. Romani, S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of experimental medicine*, 180(1) :83–93, jul 1994.
- [180] M. Russier, D. Pannetier, and S. Baize. Immune responses and Lassa virus infection. *Viruses*, 4(11) :2766–85, nov 2012.
- [181] M. Russier, S. Reynard, N. Tordo, and S. Baize. NK cells are strongly activated by Lassa and Mopeia virus-infected human macrophages in vitro but do not mediate virus suppression. *European journal of immunology*, 42(7) :1822–32, jul 2012.
- [182] D. Safronetz, K. Rosenke, J. B. Westover, C. Martellaro, A. Okumura, Y. Furuta, J. Geisbert, G. Saturday, T. Komeno, T. W. Geisbert, H. Feldmann, and B. B. Gowen. The broad-spectrum antiviral favipiravir protects guinea pigs from lethal Lassa virus infection post-disease onset. *Scientific Reports*, 5 :14775, oct 2015.
- [183] D. Safronetz, J. E. Strong, F. Feldmann, E. Haddock, N. Sogoba, D. Brining, T. W. Geisbert, D. P. Scott, and H. Feldmann. A Recently Isolated Lassa Virus From Mali Demonstrates Atypical Clinical Disease Manifestations and Decreased Virulence in *Cynomolgus* Macaques. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(8) :1316–1327, apr 2013.
- [184] C. E. Samuel. Antiviral actions of interferons. *Clinical microbiology reviews*, 14(4) :778–809, oct 2001.
- [185] F. Schandock, C. F. Riber, A. Röcker, J. A. Müller, M. Harms, P. Gajda, K. Zuwala, A. H. F. Andersen, K. B. Lovschall, M. Tolstrup, F. Kreppel, J. Münch, and A. N. Zelikin. Macromolecular Antiviral Agents against Zika, Ebola, SARS, and Other Pathogenic Viruses. *Advanced Healthcare Materials*, 6(23) :1700748, dec 2017.

- [186] K. Schlie, A. Maisa, F. Lennartz, U. Ströher, W. Garten, and T. Strecker. Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication. *Journal of virology*, 84(2) :983–92, jan 2010.
- [187] H. Schmitz, B. Köhler, T. Laue, C. Drosten, P. J. Veldkamp, S. Günther, P. Emmerich, H. P. Geisen, K. Fleischer, M. F. Beersma, and A. Hoerauf. Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes and Infection*, 4(1) :43–50, jan 2002.
- [188] J. L. Schultze and A. C. Aschenbrenner. Systems immunology allows a new view on human dendritic cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, feb 2018.
- [189] J. L. Schultze and M. Beyer. Myelopoiesis Reloaded : Single-Cell Transcriptomics Leads the Way. *Immunity*, 44(1) :18–20, jan 2016.
- [190] P. B. Sehgal. Interleukin-6 : a regulator of plasma protein gene expression in hepatic and non-hepatic tissues. *Molecular biology and medicine*, 7(2) :117–130, apr 1990.
- [191] J. Shao, Y. Liang, and H. Ly. Human Hemorrhagic Fever Causing Arenaviruses : Molecular Mechanisms Contributing to Virus Virulence and Disease Pathogenesis. *Pathogens*, 4(4) :283–306, may 2015.
- [192] M. Shimojima, U. Ströher, H. Ebihara, H. Feldmann, and Y. Kawaoka. Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *Journal of virology*, 86(4) :2067–78, feb 2012.
- [193] O. Shtanko, M. Imai, H. Goto, I. S. 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. *Journal of virology*, 84(10) :5415–22, may 2010.
- [194] O. Shtanko, S. Watanabe, L. D. Jasenosky, T. Watanabe, and Y. Kawaoka. ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *Journal of virology*, 85(7) :3631–41, apr 2011.
- [195] B. Sierra, P. Triska, P. Soares, G. Garcia, A. B. Perez, E. Aguirre, M. Oliveira, B. Cavadas, B. Regnault, M. Alvarez, D. Ruiz, D. C. Samuels, A. Sakuntabhai, L. Pereira, and M. G. Guzman. OSBPL10, RXRA and lipid metabolism confer African-ancestry protection against dengue haemorrhagic fever in admixed Cubans. *PLoS pathogens*, 13(2) :e1006220, feb 2017.
- [196] C. Sillet and G. T. Belz. *Terminal Differentiation of Dendritic Cells*, volume 120, pages 185–210. Elsevier, 2013.
- [197] S. C. Smelt, P. Borrow, S. Kunz, W. Cao, A. Tishon, H. Lewicki, K. P. Campbell, and M. B. Oldstone. Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *Journal of virology*, 75(1) :448–57, jan 2001.
- [198] A. B. Sánchez and J. C. de la Torre. Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology*, 79(11) :7262–8, jun 2005.

- [199] R. Sommerstein, L. Flatz, M. M. Remy, P. Malinge, G. Magistrelli, N. Fischer, M. Sahin, A. Bergthaler, S. Igonet, J. ter Meulen, D. Rigo, P. Meda, N. Rabah, B. Coutard, T. A. Bowden, P.-H. Lambert, C.-A. Siegrist, and D. D. Pinschewer. Arenavirus Glycan Shield Promotes Neutralizing Antibody Evasion and Protracted Infection. *PLOS Pathogens*, 11(11) :e1005276, nov 2015.
- [200] R. M. Steinman and M. D. Witmer. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10) :5132–6, oct 1978.
- [201] A. E. L. Stone, S. Giugliano, G. Schnell, L. Cheng, K. F. Leahy, L. Golden-Mason, M. Gale, and H. R. Rosen. Hepatitis C virus pathogen associated molecular pattern (PAMP) triggers production of lambda-interferons by human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS pathogens*, 9(4) :e1003316, apr 2013.
- [202] J. ter Meulen, M. Badusche, K. Kuhnt, A. Doetze, J. Satoguina, T. Marti, C. Loeliger, K. Koulemou, L. Koivogui, H. Schmitz, B. Fleischer, and A. Hoerauf. Characterization of human CD4(+) T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein. *Journal of virology*, 74(5) :2186–92, mar 2000.
- [203] S. Urata, T. Noda, Y. Kawaoka, H. Yokosawa, and J. Yasuda. Cellular factors required for Lassa virus budding. *Journal of virology*, 80(8) :4191–5, apr 2006.
- [204] S. Urata and J. Yasuda. Molecular mechanism of arenavirus assembly and budding. *Viruses*, 4(10) :2049–79, oct 2012.
- [205] E. Vela and Eric. Animal Models, Prophylaxis, and Therapeutics for Arenavirus Infections. *Viruses*, 4(12) :1802–1829, sep 2012.
- [206] M.-A. Vernet, S. Reynard, A. Fizet, J. Schaeffer, D. Pannetier, J. Guedj, M. Rives, N. Georges, N. Garcia-Bonnet, A. I. Sylla, P. Grovogui, J.-Y. Kerherve, C. Savio, S. Savio-Coste, M.-L. de Séverac, P. Zloczewski, S. Linares, S. Harouna, B. M. Abdoul, F. Petitjean, N. Samake, S. Shepherd, M. Kinda, F. R. Koundouno, L. Joxe, M. Mateo, P. Lecine, A. Page, T. M. Tchamdja, M. Schoenhals, S. Barbe, B. Simon, T. Tran-Minh, C. Longuet, F. L’Hériteau, and S. Baize. Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea. *JCI Insight*, 2(6), mar 2017.
- [207] L. Volpon, M. J. Osborne, A. A. Capul, J. C. de la Torre, and K. L. B. Borden. Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12) :5441–6, mar 2010.
- [208] D. H. Walker, J. B. McCormick, K. M. Johnson, P. A. Webb, G. Komba-Kono, L. H. Elliott, and J. J. Gardner. Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *The American journal of pathology*, 107(3) :349–56, jun 1982.
- [209] D. H. Walker, H. Wulff, J. V. Lange, and F. A. Murphy. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea-pigs, and *Mastomys natalensis*. *Bulletin of the World Health Organization*, 52(4-6) :523–34, 1975.

- [210] G. D. Wallat, Q. Huang, W. Wang, H. Dong, H. Ly, Y. Liang, and C. Dong. High-Resolution Structure of the N-Terminal Endonuclease Domain of the Lassa Virus L Polymerase in Complex with Magnesium Ions. *PLOS ONE*, 9(2) :e87577, 2014.
- [211] B. Webster, S. W. Werneke, B. Zafirova, S. This, S. Coléon, E. Décembre, H. Paidassi, I. Bouvier, P.-E. Joubert, D. Duffy, T. Walzer, M. L. Albert, and M. Dreux. Plasmacytoid dendritic cells control dengue and Chikungunya virus infections via IRF7-regulated interferon responses. *eLife*, 7, jun 2018.
- [212] S. R. Welch, L. W. Guerrero, A. K. Chakrabarti, L. K. McMullan, M. Flint, G. R. Bluemling, G. R. Painter, S. T. Nichol, C. F. Spiropoulou, and C. G. Albariño. Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems. *Antiviral Research*, 136 :9–18, dec 2016.
- [213] J. M. White, S. E. Delos, M. Brecher, and K. Schornberg. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins : multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 43(3) :189–219, 2008.
- [214] S. L. M. Whitmer, T. Strecker, D. Cadar, H.-P. Dienes, K. Faber, K. Patel, S. M. Brown, W. G. Davis, J. D. Klena, P. E. Rollin, J. Schmidt-Chanasit, E. Fichet-Calvet, B. Noack, P. Emmerich, T. Rieger, S. Wolff, S. K. Fehling, M. Eickmann, J. P. Mengel, T. Schultze, T. Hain, W. Ampofo, K. Bonney, J. N. D. Aryeequaye, B. Ribner, J. B. Varkey, A. K. Mehta, G. M. Lyon, G. Kann, P. De Leuw, G. Schuettfort, C. Stephan, U. Wieland, J. W. U. Fries, M. Kochanek, C. S. Kraft, T. Wolf, S. T. Nichol, S. Becker, U. Ströher, S. Günther, and S. Günther. New Lineage of Lassa Virus, Togo, 2016. *Emerging infectious diseases*, 24(3) :599–602, mar 2018.
- [215] WHO. WHO publishes list of top emerging diseases likely to cause major epidemics, 2015.
- [216] WHO. WHO | Lassa fever, 2018.
- [217] A. E. Williams and R. C. Chambers. The mercurial nature of neutrophils : still an enigma in ARDS? *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 306(3) :L217–30, feb 2014.
- [218] S. M. Wilson and J. C. Clegg. Sequence analysis of the S RNA of the African arenavirus Mopeia : an unusual secondary structure feature in the intergenic region. *Virology*, 180(2) :543–52, feb 1991.
- [219] W. C. Winn, D. H. Walker, and D. H. Walker. The pathology of human Lassa fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 52(4-6) :535–45, 1975.
- [220] S. Wolff, H. Ebihara, and A. Groseth. Arenavirus Budding : A Common Pathway with Mechanistic Differences. *Viruses*, 5(2) :528–549, jan 2013.
- [221] H. Wulff and K. M. Johnson. Immunoglobulin M and G responses measured by immunofluorescence in patients with Lassa or Marburg virus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, 57(4) :631–5, 1979.
- [222] H. Wulff, B. M. McIntosh, D. B. Hamner, and K. M. Johnson. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in south-east Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, 55(4) :441–4, jan 1977.

- [223] J. Xing, H. Ly, and Y. Liang. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *Journal of virology*, 89(5) :2944–55, mar 2015.
- [224] Y. K. Yong, H. Y. Tan, S. H. Jen, E. M. Shankar, S. K. Natkunam, J. Sathar, R. Manikam, and S. D. Sekaran. Aberrant monocyte responses predict and characterize dengue virus infection in individuals with severe disease. *Journal of Translational Medicine*, 15(1) :121, dec 2017.
- [225] N. E. Yun and D. H. Walker. Pathogenesis of Lassa fever. *Viruses*, 4(10) :2031–48, oct 2012.
- [226] Z. Zhang, U. Ohto, T. Shibata, E. Krayukhina, M. Taoka, Y. Yamauchi, H. Tanji, T. Isobe, S. Uchiyama, K. Miyake, and T. Shimizu. Structural Analysis Reveals that Toll-like Receptor 7 Is a Dual Receptor for Guanosine and Single-Stranded RNA. *Immunity*, 45(4) :737–748, oct 2016.
- [227] H. Zhou, A. Brekman, W.-L. Zuo, X. Ou, R. Shaykhiev, F. J. Agosto-Perez, R. Wang, M. S. Walters, J. Salit, Y. Strulovici-Barel, M. R. Staudt, R. J. Kaner, J. G. Mezey, R. G. Crystal, and G. Wang. POU2AF1 Functions in the Human Airway Epithelium To Regulate Expression of Host Defense Genes. *Journal of immunology*, 196(7) :3159–67, apr 2016.
- [228] X. Zhou, S. Ramachandran, M. Mann, and D. Popkin. Role of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) in Understanding Viral Immunology : Past, Present and Future. *Viruses*, 4(11) :2650–2669, oct 2012.
- [229] C. M. Ziegler, P. Eisenhauer, J. A. Kelly, L. N. Dang, V. Beganovic, E. A. Bruce, B. R. King, D. J. Shirley, M. E. Weir, B. A. Ballif, and J. Botten. A proteomic survey of Junin virus interactions with human proteins reveals host factors required for arenavirus replication. *Journal of virology*, 92(4) :e01565–17, nov 2017.
- [230] M. Zong, I. Fofana, and H. Choe. Human and host species transferrin receptor 1 use by North American arenaviruses. *Journal of virology*, 88(16) :9418–28, aug 2014.

## Articles publiés ou en cours de publication :

**Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea**, M.-A. Vernet, S. Reynard, A. Fizet, *J. Schaeffer*, D. Pannetier, J. Guedj, M. Rives, N. Georges, N. Garcia-Bonnet, A. I. Sylla, P. Grovogui, J.-Y. Kerherve, C. Savio, S. Savio-Coste, M.-L. de Séverac, P. Zloczewski, S. Linares, S. Harouna, B. M. Abdoul, F. Petitjean, N. Samake, S. Shepherd, M. Kinda, F. R. Koundouno, L. Joxe, M. Mateo, P. Lecine, A. Page, T. M. Tchamdja, M. Schoenhals, S. Barbe, B. Simon, T. Tran-Minh, C. Longuet, F. L'Hériteau, and S. Baize, *JCI Insight*, 2(6), march 2017

**Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells**, *J. Schaeffer*, X. Carnec, S. Reynard, M. Mateo, N. Pietrosevoli, M.-A. Dilliès, and S. Baize, *PLOS Pathogens*, accepted

# Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea

Marie-Astrid Vernet,<sup>1</sup> Stéphanie Reynard,<sup>2,3</sup> Alexandra Fizet,<sup>2,3</sup> Justine Schaeffer,<sup>2,3</sup> Delphine Pannetier,<sup>4</sup> Jeremie Guedj,<sup>5,6</sup> Max Rives,<sup>7</sup> Nadia Georges,<sup>7</sup> Nathalie Garcia-Bonnet,<sup>7</sup> Aboubacar I. Sylla,<sup>8</sup> Péma Grovogui,<sup>8</sup> Jean-Yves Kerherve,<sup>7</sup> Christophe Savio,<sup>7</sup> Sylvie Savio-Coste,<sup>7</sup> Marie-Laure de Séverac,<sup>7</sup> Philippe Zloczewski,<sup>7</sup> Sandrine Linares,<sup>7</sup> Souley Harouna,<sup>9</sup> Bing M'Lebing Abdoul,<sup>9</sup> Frederic Petitjean,<sup>9</sup> Nenefing Samake,<sup>9</sup> Susan Shepherd,<sup>9</sup> Moumouni Kinda,<sup>9</sup> Fara Roger Koundouno,<sup>9</sup> Ludovic Joxe,<sup>9</sup> Mathieu Mateo,<sup>2,3</sup> Patrick Lecine,<sup>10</sup> Audrey Page,<sup>2,3</sup> Tang Maleki Tchamdja,<sup>7</sup> Matthieu Schoenhals,<sup>1</sup> Solenne Barbe,<sup>9</sup> Bernard Simon,<sup>11</sup> Tuan Tran-Minh,<sup>11</sup> Christophe Longuet,<sup>12</sup> François L'Hériteau,<sup>13</sup> and Sylvain Baize<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre Pasteur du Cameroun, Yaounde, Cameroon. <sup>2</sup>Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, Lyon, France. <sup>3</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, Université de Lyon, INSERM, U1111, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR5308, Lyon, France. <sup>4</sup>Laboratoire P4 Jean Mérieux – INSERM (US003), Lyon, France. <sup>5</sup>INSERM, Infection, Antimicrobials, Modelling, Evolution, UMR 1137, Université Paris Diderot, Paris, France. <sup>6</sup>Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris, France. <sup>7</sup>Etablissement de Préparation et de Réponse aux Urgences Sanitaires, Ministère de la Santé, Paris, France. <sup>8</sup>Ministère de la Santé, Conakry, République de Guinée. <sup>9</sup>Alliance for International Medical Action, Montreuil, France. <sup>10</sup>Bioaster, Lyon, France. <sup>11</sup>Croix-Rouge Française, Paris, France. <sup>12</sup>Fondation Mérieux, Lyon, France. <sup>13</sup>Clin Paris-Nord, Paris, France.

**BACKGROUND.** The pathogenesis of Ebola virus (EBOV) disease (EVD) is poorly characterized. The establishment of well-equipped diagnostic laboratories close to Ebola treatment centers (ETCs) has made it possible to obtain relevant virological and biological data during the course of EVD and to assess their association with the clinical course and different outcomes of the disease.

**METHODS.** We were responsible for diagnosing EBOV infection in patients admitted to two ETCs in forested areas of Guinea. The pattern of clinical signs was recorded, and an etiological diagnosis was established by RT-PCR for EBOV infection or a rapid test for malaria and typhoid fever. Biochemical analyses were also performed.

**RESULTS.** We handled samples from 168 patients between November 29, 2014, and January 31, 2015; 97 patients were found to be infected with EBOV, with *Plasmodium falciparum* coinfection in 18%. Overall mortality for EVD cases was 58%, rising to 86% if *P. falciparum* was also present. Viral load was higher in fatal cases of EVD than in survivors, and fatal cases were associated with higher aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), C-reactive protein (CRP), and IL-6 levels. Furthermore, regardless of outcome, EVD was characterized by higher creatine kinase (CPK), amylase, and creatinine levels than in febrile patients without EVD, with higher blood urea nitrogen (BUN) levels in fatal cases of EVD only.

**CONCLUSION.** These findings suggest that a high viral load at admission is a marker of poor EVD prognosis. In addition, high AST, ALT, CRP, and IL-6 levels are associated with a fatal outcome of EVD. Damage to the liver and other tissues, with massive rhabdomyolysis and, probably, acute pancreatitis, is associated with EVD and correlated with disease severity. Finally, biochemical analyses provide substantial added value at ETCs, making it possible to improve supportive rehydration and symptomatic care for patients.

**FUNDING.** The French Ministry of Foreign Affairs, the Agence Française de Développement, and Institut Pasteur.

**Role of funding source:** The French Ministry of Foreign Affairs, the Agence Française de Développement, and the Institut Pasteur have funded the equipment and operating costs of the laboratory.

**Authorship note:** M.A. Vernet, S. Reynard, and A. Fizet contributed equally to this work.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Submitted:** May 31, 2016

**Accepted:** February 8, 2017

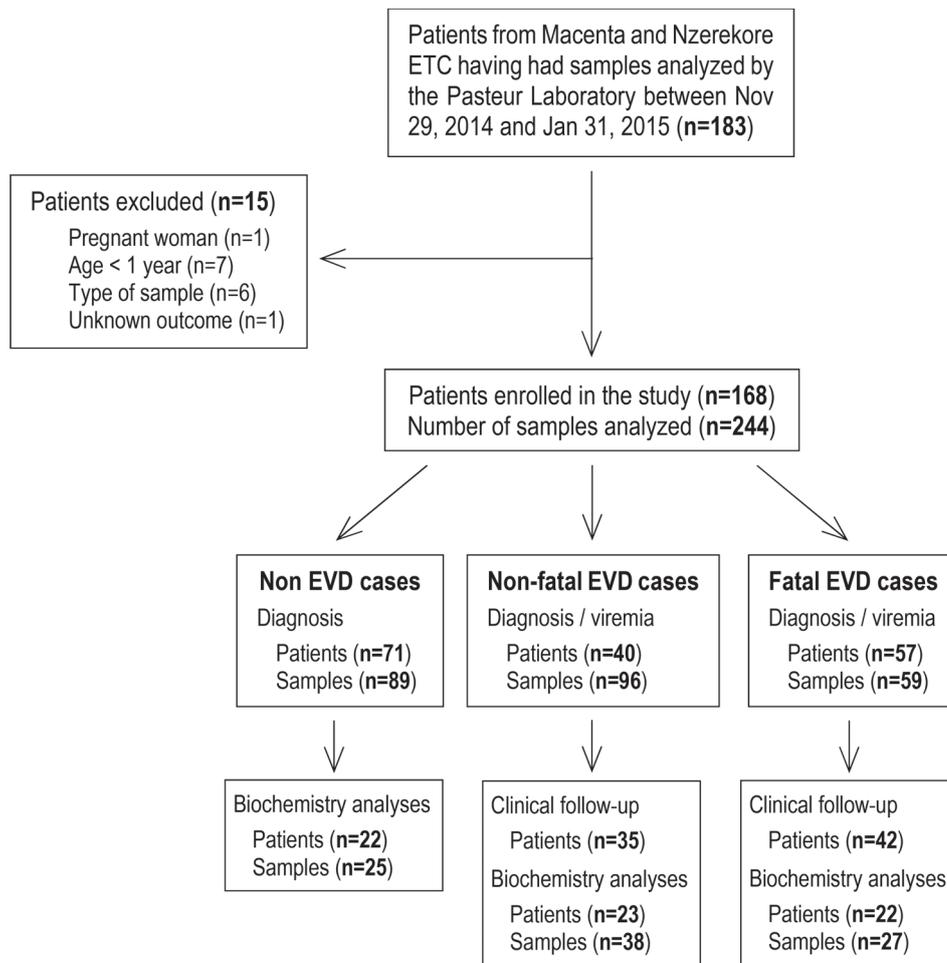
**Published:** March 23, 2017

**Reference information:**

JCI Insight. 2017;2(6):e88864.

<https://doi.org/10.1172/jci.insight.88864>.

insight.88864.



**Figure 1. Consort diagram of the study.**

## Introduction

The most severe recorded Ebola virus (EBOV) disease (EVD) outbreak ravaged West Africa, mainly Guinea, Liberia, and Sierra Leone, in 2014 and 2015 (1). Previous outbreaks of filovirus disease in Central Africa affected only a small number of people in a limited area for only a few months, but the unusually large extent of this outbreak has required extraordinary resources for its control (2). In September 2014, in the face of increasing numbers of cases in forested areas of Guinea, several Ebola treatment centers (ETCs) were established as a matter of urgency. One of these centers was set up in Macenta, a town with 45,000 inhabitants located in south-east Guinea, close to the borders with Sierra Leone and Liberia. The ETC was funded by the French Ministry of Foreign Affairs, set up by Médecins Sans Frontières, and operated by the French Red Cross, with human resources support from the Etablissement de Préparation et de Réponse aux Urgences Sanitaires (French Ministry of Health). Institut Pasteur set up and ran a labora-

tory close to the ETC to provide diagnostic capacity in the vicinity. The Pasteur Laboratory also dealt with the samples from the ETC at Nzerekore, which was operated by the Alliance for International Medical Action, until the opening of a laboratory associated with this ETC. A high turnover of technical staff was required to operate the laboratory over time, and the teams often lacked experience in handling risk group 4 agents. We therefore decided to provide the laboratory staff with a very high level of biosafety, similar to that used in industrialized countries for the handling of such viruses. The laboratory was set up to provide physicians with facilities for Ebola diagnosis, differential diagnosis for other frequent diseases (malaria and typhoid fever), and the testing of essential biological parameters as well as to improve the supportive rehydration care of patients. Indeed, in the absence of effective specific treatment, symptomatic care was essential, and the higher survival rates observed for repatriated patients receiving intensive care in Northern countries demonstrated the crucial need to improve the standard of care in field facilities. Knowledge about the patterns of change in biological parameters during human EBOV infection was quite limited, but substantial progress has resulted from the last EBOV outbreak. Data for Sudan virus-infected (SUDV-infected) patients demonstrated liver and tissue injury, together with renal failure and possible acute pancreatitis (3). More recent reports of biological follow-up for isolated patients or cohorts have confirmed these results and suggested that rhabdomyolysis is a common features in EVD (4–8). We report here the clinical, virological, and biological parameters recorded for a cohort of EBOV-infected patients hospitalized in the Macenta and Nzerekore ETCs between December 2014 and January 2015 who did not receive any experimental EBOV-specific therapy.

## Results

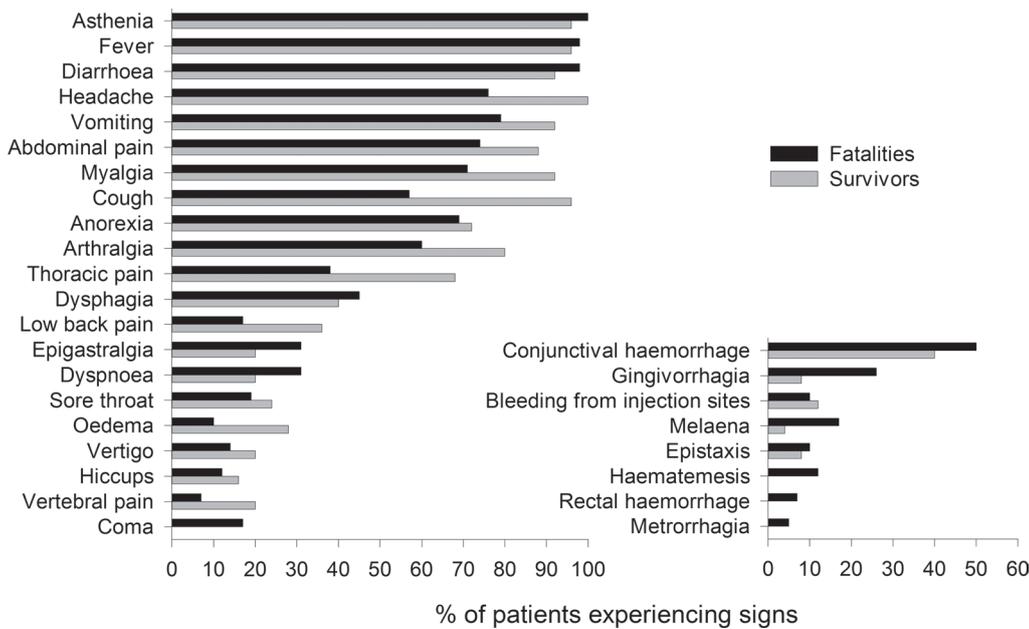
*Clinical description.* From November 29, 2014, to January 31, 2015, 183 patients with symptoms consistent with the WHO definition of suspected EVD who were admitted to one of the two ETCs had their samples sent to the laboratory to be tested for diagnostic purposes. Among them, 168 patients were included in the study according

Table 1. Patient Characteristics

	n	Death		Univariable			Multivariable		
		n	(%)	OR	[95% CI]	P	aOR	[95% CI]	P
Sex									
Male	35	18	(51)	0.6	[0.3-1.4]	0.3			
Female	62	39	(63)						
Time between symptom onset and admission									
≤3	23	11	(48)	0.3	[0.1-0.9]	0.04	0.5	[0.08-3]	0.4
>3	51	37	(72)	1					
Baseline viremia									
<25,000	41	16	(39)	0.02	[0.001-0.11]	0.0002	0.07	[0.003-0.5]	0.02
≥25,000	33	32	(97)	1					
Baseline titers (log)									
<6	28	13	(46)	0.07	[0.003-0.4]	0.01	0.1	[0.006-1.2]	0.1
≥6	14	13	(93)	1					
Baseline IL-6									
<29	35	17	(49)	0.2	[0.04-0.6]	0.006	0.5	[0.07-3.2]	0.4
≥29	26	22	(85)	1					
Age (yr)									
0-9	11	10	(91)	7	[0.9-57]	0.08			
10-19	19	9	(47)	0.6	[0.2-1.7]	0.5			
20-44	45	22	(49)	0.7	[0.3-1.4]	0.4			
≥45	22	16	(73)	1.9	[0.7-5.2]	0.3			
Presence of <i>P. falciparum</i>									
Yes	14	12	(86)	4	[0.9-27.2]	0.09			
No	60	36	(60)						
Ebola treatment center									
Nzerekore	29	19	(65)	1.0	[0.4-2.8]	0.9			
Macenta	45	29	(64)	1					

All patients were included for univariate analysis. The age and the delay of 2 and 1 patients, respectively, were missing, and the median value was used. Baseline titers, delay, viremia, and IL-6 were dichotomized using the cutoff maximizing the Youden's index. Age groups were categorized as follows: age category 1: less than 9 years; age category 2: ranging from 10 to 19; age category 3: ranging from 20 to 44; and age category 4: over 44 years old. We chose to be conservative, and only variables with a *P* value less than 0.05 were included in multivariate analysis. Because IL-6 and titers were missing in several patients, we checked that the conclusions of the multivariable analysis were unchanged by running two separate analyses where these variables were not included. OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio.

to our criteria (Figure 1). During this time frame, the laboratory also received samples from 30 patients from places other than the two ETCs, and these were excluded from the study. Testing confirmed EBOV infection in 58% (*n* = 97) of these patients (mean age: 30.1 years, range: 1-68 years), and the mortality rate for these cases was 59% (Table 1). The mortality rate was similar between both ETCs. Although a lower mortality rate has been observed for patients admitted within 3 days after the onset of symptoms, this difference was not significant using multivariate analysis (Table 1). The mean age of the patients was independent of disease outcome, although mortality tended to be higher (though the differences were not significant) in patients under the age of 10 years (91%) or over the age of 45 years (73%). No evidence for recent typhoid fever (IgM<sup>+</sup>) was found in any patient. In contrast, we found that 19% (*n* = 26) of the patients admitted to the ETCs were positive for *Plasmodium falciparum*. There was no difference in the proportion of *P. falciparum*-positive patients between EBOV-infected and control patients. Coinfection with *P. falciparum* and EBOV seems to be associated with poor prognosis, as a fatal outcome was observed in 86% of coinfecting patients, whereas the mortality rate among *P. falciparum*-negative EBOV-infected patients was 60%. This difference was not significant (*P* = 0.12), but the observed trend suggests that coinfection with *P. falciparum* may increase mortality in patients with EVD. However, of the *P. falciparum*-EBOV-positive patients, 7 of 12 were under 10 or above 45 years old, probably accounting for the dramatic mortality observed at these ages. Rather than presenting the clinical signs observed in patients at admission, we have chosen to report the symptoms experienced throughout the course of the disease. Indeed, as the period between the onset of symptoms and admission was highly variable (mean: 4.6 days, range: <1-14 days), a comparison



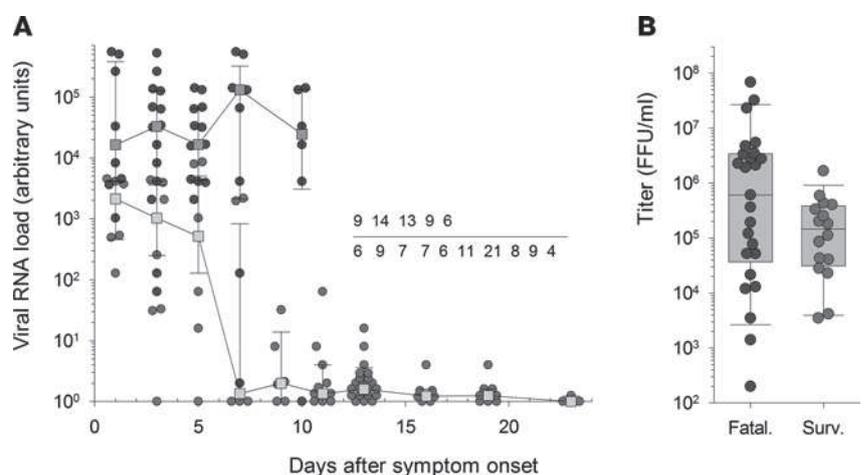
**Figure 2. Percentage of Ebola virus disease patients with a fatal (n = 42) or nonfatal (n = 35) outcome experiencing the various symptoms during the course of the disease.**

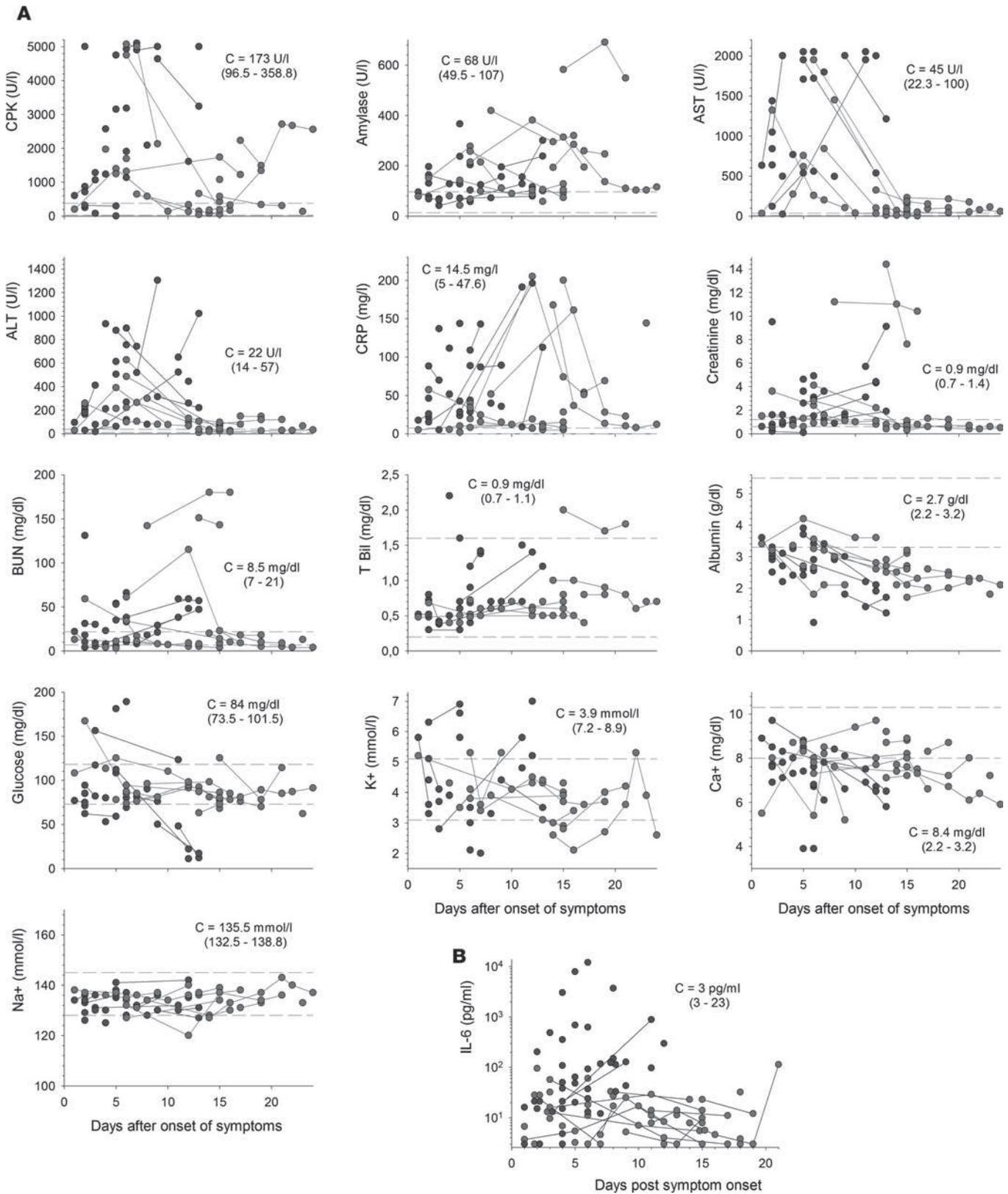
of clinical presentation at admission between patients would not provide relevant information for this study. Almost all patients for whom we obtained complete clinical follow-up information displayed fever, asthenia, and diarrhea (Figure 2). Fever and asthenia were observed in almost all patients at admission, whereas diarrhea occurred later in the clinical course of the disease. Headache, vomiting, abdominal pain, myalgia, cough, anorexia, arthralgia, and thoracic pain were observed in most patients. With the exception of anorexia, all these symptoms were reported more frequently in survivors than in fatal cases. But patients with severe illness were very often unable to complain of symptoms such as headache, myalgia, and arthralgia. Moreover, patients with symptoms associated with dehydration or low food and drink intake (diarrhea, vomiting, nausea, hemorrhage) may be less inclined to complain of severe clinical signs, such as headaches, myalgias, and arthralgias, leading to a bias in the clinical description. Other signs, such as dysphagia, low back pain, epigastralgia, dyspnea, sore throat, edema, vertigo, hiccups, vertebral pain, and coma, were less common. Finally, conjunctival hemorrhages were reported in about half of the patients in both the survivor and fatal case groups, whereas other hemorrhagic signs were observed in 5%–20% of fatal cases and 0%–10% of survivors.

*Time course of viremia in patients.* Viral load was high at admission in all patients, regardless of outcome, even for patients admitted 1 day after disease onset (Figure 3). Viral RNA load at admission was significantly higher in fatal cases than in survivors, confirming that the intensity of viremia at admission could be used as a prognostic marker, and was correlated with disease severity (Table 1). EBOV RNA levels remained high throughout the course of the disease in fatal cases, whereas viremia decreased in survivors about 1 week after the onset of symptoms, with the virus becoming undetectable about 3 weeks after disease onset. However, although viral infectious titers at admission were higher in fatal cases than in survivors, this difference was not significant (Table 1).

**Figure 3. Viral load in EBOV-infected patients. (A)**

Viral RNA load, quantified by real-time RT-PCR, is presented as the median ± 95% CI for samples obtained at different times after disease onset in fatal (dark gray squares) and nonfatal (light gray squares) Ebola virus disease (EVD) patients. Individual values are also presented for samples obtained in fatal (red circles) and nonfatal (green circles) EVD patients. Values are expressed in arbitrary units (AU), calculated as follows:  $AU = 2^{(34 - \text{cycle threshold})}$ , with a limit of detection for the assay corresponding to cycle threshold (Ct) = 34. The number of samples used to calculate the different median values is indicated for fatal (top line) and non-fatal (bottom line) patients. **(B)** Infectious viral titers measured at admission are presented with individual values and box plot for fatally infected (Fatal, n = 26) or surviving (Surv, n = 16) patients. Only samples with a Ct < 28 were titrated.





**Figure 4. Changes in biological parameters during EVD.** (A) Levels of creatine kinase (CPK), amylase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), C-reactive protein (CRP), creatinine, blood urea nitrogen (BUN), total bilirubin (T Bil), albumin, glucose, potassium (K<sup>+</sup>), corrected calcium (Ca<sup>2+</sup>), and sodium (Na<sup>+</sup>) in plasma from fatal (red circles) and nonfatal (green circles) Ebola virus disease (EVD) patients are presented according to the number of days after disease onset. Samples coming from the same patients are linked by a line. Thirty samples from fatal EVD patients are presented, except for AST (*n* = 25), CPK (*n* = 26), K<sup>+</sup> (*n* = 24), albumin (*n* = 29), CRP (*n* = 28), and T Bil (*n* = 27). Forty samples from nonfatal EVD patients are presented, except for AST, BUN, CRP, and T Bil (*n* = 39); CPK (*n* = 38); and K<sup>+</sup> (*n* = 37). The median ± 95% CI (C) of individual values for febrile

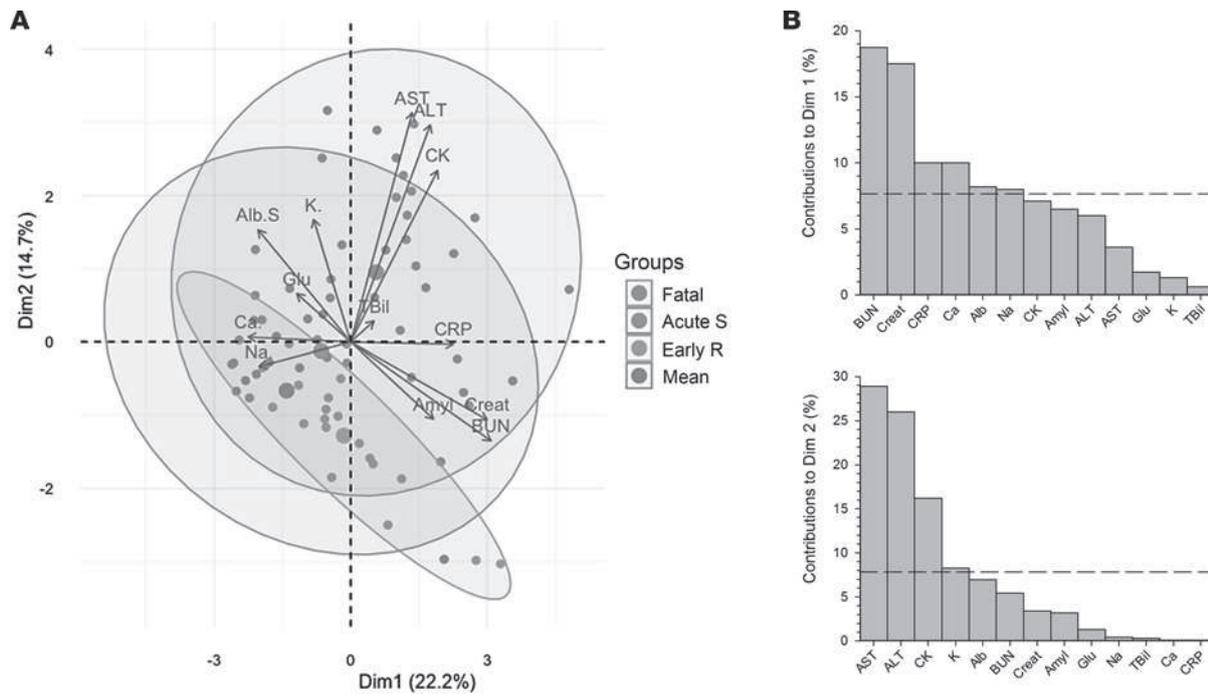
patients without EVD ( $n = 27$ ) is presented. The dotted lines indicate the limits of the range of normal values, as indicated by the assay manufacturer. **(B)** Plasma IL-6 concentrations for fatal (red circles,  $n = 43$ ) and nonfatal (green circles,  $n = 56$ ) EVD cases are shown. Samples coming from the same patients are linked by a line. The median  $\pm$  95% CI of individual values for febrile patients without EVD ( $n = 15$ ) is presented.

*Changes in biological parameters during EVD.* Most patients had high levels of creatine kinase (CPK) (Figure 4A and Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88864DS1>). These levels increased until death in the fatal cases, whereas, in survivors, they peaked a few days after disease onset but remained high in some patients until recovery. Plasma amylase concentrations were also high in most patients, regardless of outcome, and remained high until the virus was no longer detectable in survivors. Very high levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were observed during the course of the disease. This increase was transient, with the levels of these enzymes decreasing about 1 week after the onset of symptoms, in survivors, whereas they continued to increase relentlessly until death in the fatal cases. Furthermore, a high AST/ALT ratio was typically observed in patients with EVD (mean:  $3.93 \pm 0.28$  among viremic patients,  $n = 41$ ). Levels of C-reactive protein (CRP) were also high during the symptomatic phase, particularly in fatal cases, and these levels seemed to increase earlier in fatal cases than in survivors. Creatinine concentrations were abnormally high during the first half of the symptomatic period in most survivors and were high until death in the fatal cases. Uremia was detected in some survivors and fatal cases, whereas bilirubin levels remained in the normal range in most patients. Albumin concentrations decreased during the course of the disease in both fatal cases and survivors. Glycemia was unaltered in nonfatal infections but decreased steadily until death in fatal cases, with severe hypoglycemia observed in the terminal stages.  $K^+$  concentrations remained within the normal range in most patients, with only a minority of patients experiencing hypokalemia. This electrolyte imbalance tended to be observed late in the course of the disease in survivors and was not correlated with a poor outcome. Hypocalcemia was not a common feature in EBOV infection, as only a minority of patients had  $Ca^{2+}$  concentrations below the normal range. Finally,  $Na^+$  levels remained normal throughout the course of the disease in all patients.

Principal component analysis was used to summarize the information represented by the 13 different biological parameters studied in three distinct populations: EVD survivors during acute disease (from 1 to 13 days after onset of symptoms), EVD survivors during early recovery (from 13 to 24 days after disease onset), and fatal EVD cases. The variables driving the transition among these populations, which are, thus, linked to prognosis, are represented as arrows in Figure 5A. The length of these arrows is correlated to the strength of the variable in the transition of one state to another. Contributions of these factors to the first 2 dimensions are represented in Figure 5B and have a cumulative percentage of explained variance of 36.9%. Variables most linked to the transition to fatal cases and to early recovery in survivors are increased blood urea nitrogen, creatinine, and CRP and decreased  $Ca^+$  and albumin, major contributors of the first dimension. Increase in levels of AST, ALT, CPK, and  $K^+$ , major contributors of the second dimension, drive, most importantly, the transition to fatal cases only.

Finally, IL-6 levels were moderately increased in the survivors but were nevertheless higher than in negative controls (Figure 4B and Supplemental Figure 1). By contrast, in fatal cases, IL-6 levels were high from 3 to 4 days after symptom onset and remained so until death, with a maximum 5 to 6 days after disease onset. These levels were higher than those observed in negative controls and survivors at 5 to 6 days after the appearance of clinical signs.

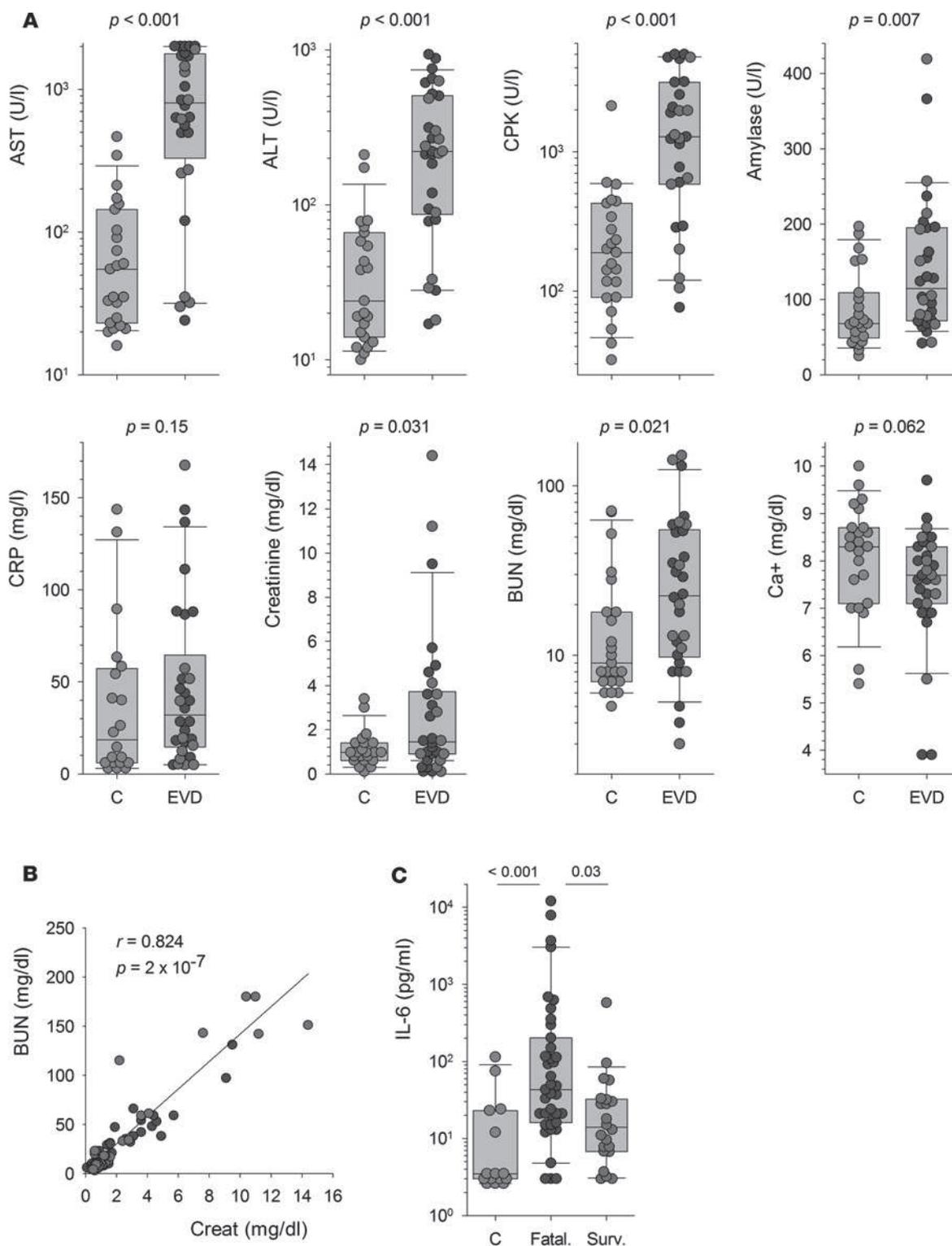
*Association between biochemical parameters and EVD.* We investigated the association between biochemical parameters and EVD by comparing the values obtained within the first 2 days after admission in EVD patients and febrile controls (Figure 6A). AST and ALT levels were significantly higher in patients with EVD than in those in which EBOV infection was excluded. The concentrations of CPK, amylase, creatinine, and blood urea nitrogen were also significantly higher in EVD patients than in EBOV-negative patients. Higher CRP levels and lower  $Ca^{2+}$  concentrations were observed in EVD patients as opposed to EBOV-negative patients, but these differences were not significant. No significant difference was found between the different groups for levels of total bilirubin, albumin, glucose,  $K^+$ , and  $Na^+$  (data not shown). We observed a strong correlation between uremia and creatinine levels in EVD patients, whatever the outcome was (Figure 6B). Finally, significantly higher levels of IL-6 were detected at admission in fatal EVD cases as opposed to nonfatal EVD patients and EBOV-negative patients (Figure 6C). Furthermore, an IL-6 concentration over 29 pg/ml was significantly associated with a fatal outcome during EVD when a univariable analysis was performed (Table 1). However, this association was not significant with a multivariable analysis.



**Figure 5. Principal component analysis of biological parameters throughout the course of the disease.** Principal component analysis (PCA) of 13 different biological parameters in 3 distinct populations was performed. PCA is used to summarize the information contained in continuous multivariate data by reducing the dimensionality of the data without losing any important information. Samples obtained from surviving Ebola virus disease (EVD) patients during the symptomatic phase (i.e., 0–13 days after onset of symptoms) (Acute S) or during early recovery (more than 13 days after onset of symptoms) (Early R) and from fatal EVD patients (Fatal) were classified in 3 distinct groups on a 2-dimensional visualization plot of this PCA (A). The variables driving the transition between these populations, thus linked to prognosis, are represented by arrows. The purple circle represents the mean of the 3 populations. Contributions of these factors to dimensions 1 and 2 are represented in B.

## Discussion

Despite the limited period of time over which the ETC received patients and the laboratory processed samples, this study provides important insight into the changes in clinical, virological, and biological parameters during EVD. The outcome of EVD was independent of the time between symptom onset and admission, as observed at other ETCs (5, 9, 10). Consistent with other reports (9, 10), the mortality rate was particularly high in patients under the age of 10 years or over the age of 45 years, but the differences were not significant. The mortality rate at our ETC was consistent with the global mortality recorded in Guinea (9). Almost all patients with *P. falciparum* and EBOV coinfection admitted to the ETC died, but this result was not significant. The high number of children below the age of 10 years among the *P. falciparum*–EBOV–positive patients (5 of 12) probably induced a bias in the mortality. Treatment for malaria (artemether-lumefantrine per os and artesunate i.v.) was systematically administered to all patients immediately on admission and was maintained when the patient tested positive for *P. falciparum*. We have no clear explanation for this observation of an aggravating effect of *P. falciparum* malaria. *Plasmodium* may bias the antiviral immune response, as this parasite is known to suppress adaptive immunity to heterologous antigens through the hemozoin-induced failure of dendritic cell functions (11). A role of the drug combination used at our ETC in the increased mortality is also a possibility, as suggested by a recent study showing a decrease in mortality in artesunate-amodiaquine–treated EVD patients compared with artesunate-lumefantrine–treated ones (12). Indeed, this treatment may be harmful because of the risk of prolongation of QT-interval and of fatal arrhythmias in patients presenting hypokalemia or hypomagnesemia. However, we were not able to evaluate the effect of artesunate-lumefantrine on mortality associated with prolonged QT-interval, as electrocardiograms were not available in the ETCs. The incidence of malaria was similar in all patients, regardless of EBOV infection status, and was particularly high. This incidence is consistent with the high rates of mortality unrelated to EVD observed in forested areas of Guinea during the outbreak, with most of these deaths due to untreated malaria and measles (13–15). In contrast, no increase in mortality was associated with coinfection with *P. falciparum* in another study in Guinea (16), and a recent report described a reverse trend and suggested that coinfection may



**Figure 6. Association between biochemical parameters and EVD.** (A) The levels of analytes measured within the first 2 days after admission are represented as individual values for febrile non-Ebola virus disease (non-EVD) patients (C, gray circles;  $n = 27$ ) and for patients with fatal (EVD, red circles;  $n = 27$ ) for aspartate aminotransferase [AST], creatine kinase [CPK], C-reactive protein [CRP], and corrected calcium [ $\text{Ca}^{2+}$ ];  $n = 30$  for alanine aminotransferase [ALT], amylase, creatinine, and blood urea nitrogen [BUN] and nonfatal (EVD, green circles;  $n = 19$ ) EVD. Box plots calculated using individual values from febrile controls (C;  $n = 27$ ) and from EVD patients (EVD;  $n = 46$  or  $49$ ) are also represented. The result of the Wilcoxon test used to compare the levels of analytes between febrile non-EVD patients and EVD patients is indicated for each analyte. (B) Correlation between BUN and creatinine levels in EVD patients ( $n = 68$ ). Fatal (red circles,  $n = 30$ ) and nonfatal (green circles,  $n = 38$ ) patients are presented, but the statistical analysis was performed in all EVD patients. The regression line is shown, and the correlation coefficient and  $P$  value calculated using a Spearman rank order correlation test are indicated. (C) Levels of IL-6 measured at admission are presented as individual values for febrile non-EVD patients (C,

gray circles;  $n = 15$ ) and for patients with fatal (fatal., red circles;  $n = 39$ ) and nonfatal (Surv.;  $n = 22$ ) EVD. Box plots calculated using these individual values are also represented. The results of the ANOVA on ranks test used to compare the levels of IL-6 between the different groups are indicated.

be associated with increased survival (17). Further investigation would therefore be needed to definitively clarify this point. Besides, the elevated number of *P. falciparum*-positive patients admitted in the ETC argues for a robust improvement in preventative measures against malaria in the general population to limit the admission of febrile EBOV-negative patients in the ETC.

Fever and/or asthenia were experienced by almost all EVD patients. Most symptoms, other than hemorrhagic symptoms and coma, occurred frequently during EVD and at the same frequency regardless of outcome. This finding contrasts with those of other reports, in which most other signs were more frequently observed in fatal cases than in survivors. This discrepancy probably reflects our reporting of the symptoms observed throughout the entire course of the disease, whereas other studies have focused on the clinical signs recorded at admission (5, 8, 9, 18, 19). However, we have to keep in mind that the personal protective equipment used by the medical staff and the limited amount of time to examine the patients impeded the monitoring of clinical signs.

Viral load was high in all EBOV-infected patients, even those diagnosed 1 day after symptom onset. No initial negative EBOV RT-PCR results were obtained for symptomatic patients for whom positive results were obtained on subsequent days. There was just one dubious result for a patient admitted 2 days after symptom onset. However, given the very high viral load found the following day ( $Ct = 16$ ), this inconclusive result was probably due to technical problems with the RT-PCR assay rather than a low viral load. It is important to bear in mind that EBOV infection cannot be excluded on the basis of a negative EBOV RT-PCR result at early stages of the disease. Based on the results obtained, we decided to limit this early period of uncertainty to the first 3 days after the onset of EBOV-associated symptoms in a patient, rather than the 4-day waiting period that was initially used when the ETC first opened. Indeed, it is important to limit the time for which “negative” patients stay in the ETC to prevent their contamination with EBOV in the ward and the unnecessary occupation of beds and due to the lack of care appropriate for the patient’s real illness. Viral load remained very high until death in fatal cases but declined rapidly about 1 week after onset in survivors, suggesting that immune responses were efficient at this time point. The difference in viral RNA load between outcomes was very large, and a viral load over 25,000 AI (arbitrary units) (corresponding to a  $Ct = 19.5$ ) was significantly associated with fatal outcome. Thus, viral RNA load at admission was correlated with disease severity. Therefore, this parameter is of high prognostic value and could be used to select the patients in most need of intensive care or likely to benefit from experimental therapy. A similar conclusion was drawn in a study of the cohort recruited for the JIKI favipiravir trial and also in two cohorts in Sierra Leone (20, 21), demonstrating the robustness of this correlation. However, the difference between infectious viral load at admission according to the disease outcome was less pronounced than for RNA viral load and nonsignificant using a multivariate analysis, and this discrepancy remains unclear. We allowed the discharge of recovering patients after 2 negative EBOV RT-PCR tests, ideally performed 48 hours apart or 24 hours apart if the ETC was saturated. This interval between consecutive tests ensured that the patients discharged were aviremic and that viral load in urine had decreased considerably. It would be unrealistic and unfeasible to wait for the total disappearance of EBOV RNA from the urine before discharging patients in the field in an epidemic setting. Moreover, as EBOV persists in semen for a very long time and as transmission of EBOV through sexual intercourse after recovery can occur (22–24), sexual advice and a hundred condoms were given to recovering patients before their discharge. Consistent with previous studies, which found a correlation between EVD severity and infectious viral load (25), we observed a similar trend in our patients, but the difference was not significant, probably because we did not quantify viral infectious load in patients with a low viral RNA load ( $Ct > 27$ ).

The acquisition of biological parameters during EVD provided us with useful data correlated with clinical observations, making it possible to optimize patient monitoring and care. In line with previous reports (3–5, 8, 26, 27), we confirmed that massive cytolysis occurred during EVD, particularly in patients with fatal infections who had high levels of AST and ALT. These data are consistent with hepatic damage, but the high AST/ALT ratio and CPK concentration also indicate that tissues other than the liver were harmed and that massive rhabdomyolysis was associated with the acute phase of EVD. Bilirubin levels were normal, suggesting that fulminant hepatic failure is not a feature of EVD, even in the most severe cases (5). The hypocalcemia observed in a substantial proportion of patients, which continued to worsen

until death in fatal cases, is also consistent with rhabdomyolysis, which results in the transfer of free ionized  $\text{Ca}^{2+}$  into altered tissues (28). The mechanisms of acute virus-induced rhabdomyolysis are unknown, but these events can be linked to the intense myalgia frequently experienced by EBOV-infected patients (4) and may be involved in the pathogenic cascade that leads to terminal shock and death. Indeed, the necrosis of muscular tissue creates a “third space” in which intravascular fluid accumulates, leading to hypovolemia. In addition, muscle damage can lead to the release of endotoxins, vasoconstricting and prothrombotic compounds in the circulation, and therefore can participate in the shock syndrome, coagulation disorders, and renal failure observed during EVD (28, 29). Levels of AST, and, to a lesser extent, ALT, appeared to be the most powerful markers of severity during EVD in our cohort. A similar observation was previously reported for EBOV and SUDV (3–5, 8). Striking differences were observed in the patterns of change in biological analyte levels associated with tissue damage during disease. Indeed, whereas AST, ALT, and CPK levels increased steadily until death in fatal cases, the opposite pattern was observed in survivors, with only a transient peak about 5 to 6 days after symptom onset, followed by a decline. These observations suggest that EBOV causes limited damage over a short time in nonfatal infections. A similar pattern was observed for IL-6, with high levels throughout the disease in fatal cases and only a moderate, transient increase in survivors. These findings differ from other studies of EBOV (30–32) in which concentrations of IL-6 were higher during nonfatal infections than in fatal cases, whereas consistent results were obtained with SUDV-infected patients (33) and with cynomolgus monkeys with severe Lassa fever (34). IL-6 is produced principally by activated monocytes/macrophages, mostly in liver. This release of IL-6 probably reflects tissue damage and hepatic regeneration (35) and could, therefore, be used as a marker of disease severity. High IL-6 levels may also result from tissue damage in other organs and muscles, consistent with the concomitantly high levels of AST. The high levels of IL-6 observed are also consistent with the fever associated with EVD, as this cytokine is pyrogenic (36). Moreover, IL-6 may be involved in pathogenesis, exacerbating endothelial permeability and fluid loss (37). High amylase concentrations were associated with EVD. Abnormally high amylase levels remained after the disappearance of viremia in survivors. These data may be consistent with acute pancreatitis, which could be linked to the intense epigastric and thoracic pain experienced by most patients, including two-thirds of survivors. Our findings differ from those reported for SUDV-infected patients, in whom high amylase levels were detected only in cases of fatal infection (3). Acute pancreatitis may also participate in hypocalcemia and more generally in the pathophysiological changes observed during EVD (38). However, multiple conditions other than pancreatitis are associated with high serum amylase, including salivary gland inflammation, renal failure, other acute abdominal syndromes, and tissue damages. As previously reported (5, 39), CRP concentrations increased in patients, indicating the occurrence of inflammatory responses during EVD. The persistence of abnormally high CRP levels after the disappearance of viremia in survivors is unclear. We hypothesize that this could be due to the occurrence of secondary bacterial infections in some patients because of bacterial translocation in the damaged intestinal tract (39), but further clinical investigation would be necessary to demonstrate it. Changes in renal function were also observed in some patients, particularly during severe disease, as illustrated by the high levels of creatinine and blood urea nitrogen and their highly significant correlation. However, unlike other studies (4, 5, 8), we found that there was no significant correlation between high creatinine levels and a fatal outcome. Nevertheless, we found that the levels of both products increased during the course of the disease in fatal cases, suggesting that renal failure is a common feature of the terminal stages of EVD. Albumin concentration decreased throughout the disease in both groups of patients, with low levels persisting for up to 25 days after disease onset in survivors. This decrease may reflect undernourishment due to anorexia and vomiting, but it may also result from capillary leakage, third spacing, liver failure, and renal loss, as previously suggested (3). Hypoglycemia was also observed in some fatal cases, particularly in the last few days before death. With the exception of a small, nonsignificant decrease in hypoglycemia reported for SUDV-infected patients who died (3), we are aware of no other similar report. It is unclear whether hypoglycemia resulted from metabolic imbalance, undernutrition, and/or multiorgan failure, but it may have contributed to the fatal outcome, given the very low levels observed in the last 2 days before death in 4 patients. This hypoglycemia should be taken into account during rehydration. It would be interesting to investigate changes in glycemia during EVD further to determine its contribution to terminal shock and death. Electrolyte balance remained essentially in the normal range in most patients, except for a moderate decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  levels relative to those in EBOV-negative patients. However, only some patients had values below the normal range. Hypocalcemia has already been described in patients that died from SUDV

infection (3) and in some EBOV-infected patients (27). Kalaemia was normal in most patients, but hyperkalaemia was observed in 25% of fatal cases; a few fatal cases and survivors were hypokalemic, although hypokalemia was observed only after the acute phase of the disease in survivors. It is difficult to interpret these data, as there were probably antagonistic effects modulating  $K^+$  levels: digestive loss due to vomiting and diarrhea, increases due to cell lysis, and input from Ringer lactate perfusion. However, the observation of hyperkalaemia only in fatal cases is consistent with a role of cell lysis in this event, as rhabdomyolysis leads to release of cellular  $K^+$  into the circulation. Hyperkalaemia, together with hypocalcemia, can cause cardiac arrhythmias and even heart failure. It would be interesting to investigate the involvement of this phenomenon in the sudden death observed in some young patients in the ETC (28).

In conclusion, this study has increased our knowledge of the clinical, virological, and biological features associated with the different outcomes of EBOV infection. Our findings confirm that early viral load is a prognostic marker for the outcome and for the intensity of tissue damage. Rhabdomyolysis, liver damage, and inflammation were the main biological changes occurring during EVD, regardless of outcome. Our data suggest that coinfection with *P. falciparum* greatly affects mortality, despite treatment, but further investigations are required to confirm and explain this phenomenon. Finally, we confirmed that being able to perform biochemistry analyses within the ETC was important and of added value, making it possible to improve the supportive care tailored to the patient and to use the available human and drug resources rationally.

## Methods

**Study design.** This prospective observational study included data for all suspected cases of EVD admitted to the Macenta or Nzerekore ETC between November 29, 2014, and January 31, 2015. The clinical data were collected from the patients' records at each ETC, and the biological data were obtained from The Pasteur Laboratory in Macenta. Patients with a confirmed diagnosis of EBOV infection were included and classified according to outcome. The patients for whom EBOV infection was excluded were included in the study as febrile controls. The number of blood samples obtained per patient was variable, ranging from a single sample for patients dying in the days following admission to 3–6 for survivors or patients for whom biochemical analyses were performed.

**Blood samples.** Blood samples were collected into  $K_2$ EDTA- or heparin-coated Vacutainer tubes (BD) for viral RT-PCR assays and biochemical analysis, respectively. All steps involving infectious biological samples were performed in a level-3 safety cabinet (Innosafe, Eurobioconcept). Patients were admitted to the ETC as EBOV-infected patients on the basis of a positive RT-PCR result for EBOV. If a negative result was obtained with a sample obtained fewer than 3 days after disease onset, another diagnostic test was performed on the following day. EBOV infection was excluded, and the patient was discharged from the ETC on the basis of a negative RT-PCR assay result for a sample obtained at least 3 days after the onset of symptoms. EBOV-infected patients were discharged once their symptoms had disappeared and 2 negative EBOV RT-PCR results had been obtained 48 hours apart.

**Etiological diagnosis.** Rapid tests for malaria (ONSITE PF/pan Malaria Ag Rapid Test, CTK Biotech) and typhoid fever (ONSITE Typhoid IgG/IgM Combo Rapid Test/K7, CTK Biotech) were performed with whole blood obtained at the admission of the patients. The malaria rapid test can discriminate between infections caused by *P. falciparum* and infections due to other species. Typhoid test results were considered positive only if IgM was detected.

EBOV infection was diagnosed by RT-PCR with the Real-Star Filovirus Screen RT-PCR kit 1.0 (Altona Diagnostics). Briefly, EDTA-treated blood was centrifuged, and total RNA was extracted from the resulting plasma with the QIAmp Viral RNA kit (Qiagen). RT-PCR was performed according to the manufacturer's specifications, with a Light Cycler 96 instrument (Roche Diagnostics). Positive results were reported in arbitrary units, calculated as follows:  $2^{\Delta C_t \text{ threshold}}$ , with  $\Delta C_t = 34 - \text{observed Ct}$ , assuming that  $C_t = 34$  constituted the limit of sensitivity for the assay.

**Care of patients.** The patients included in this study have not received any EBOV-specific experimental therapy, and only supportive care was given to them. No advanced life support methods, such as artificial ventilation, dialysis, and insertion of central venous catheter, were available in the ETCs. Multivitamins, paracetamol (oral or parenteral), either an oral combination of artemether and lumefantrine or parenteral artesunate in case of severe vomiting and diarrhea, an empirical antimicrobial therapy (either oral ciprofloxacin or cefixime, or parenteral ceftriaxone), and anthelmintic albendazole were systematically administered to all patients whatever their EBOV status was. Tramadol, omeprazole, and diazepam were prescribed if needed.

Oral rehydration salts and Plumpy'Nut (Nutraset) were given to all patients in addition to meals prepared twice a day. Ringer lactate was the main parenteral rehydration solution, with serum glucose 5% in addition sometimes. There was no specific care algorithm used to guide fluid and electrolyte therapy. The use of Ringer lactate solution and electrolyte therapy was limited to the most severely ill patients because a limited stock of parenteral rehydration solutions and electrolytes was available in the ETCs during the study period. When available, the results of biochemical analyses were used to select the patients receiving these therapies.

**Biochemical analyses.** Biochemical analyses were performed on whole blood with a Piccolo Xpress instrument and the Amlyte 13 panel (Abaxis), according to the manufacturer's recommendations. Corrected calcemia was calculated as follows: corrected  $[Ca^{2+}]$  (mg/dl) = total  $[Ca^{2+}]$  (mg/dl) +  $0.025 \times (40 - [\text{albumin}])$  [in g/l]).

**Virus titration.** Vero E6 cells (ATCC) were incubated for 1 hour at 37°C with several dilutions of plasma, and 1.6% carboxy-methyl-cellulose (BDH Laboratory Supplies) in DMEM (Life Technologies) was then added. Infectious foci were detected after 7 days of culture by incubation with a cocktail of 3 mouse monoclonal antibodies against EBOV GP, developed and provided by Laurent Bellanger (Laboratoire Innovations technologiques pour la Détection et le Diagnostic, Commissariat à l'énergie atomique, Marcoule, France) followed by alkaline phosphatase-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) and NBT/BCIP substrate (Thermo-Fisher). Results are expressed in FFU per ml.

**IL-6 quantification.** IL-6 was quantified in plasma from EBOV-infected patients ( $n = 99$ ) and from febrile patients not infected with EBOV ( $n = 8$ ) and in plasma from healthy donors ( $n = 6$ ) with a Magpix instrument (EMD Millipore, Merck) and the Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTMA60K-PX38, EMD Millipore, Merck), according to the manufacturer's instructions. Virus titration and IL-6 quantification were performed in the Jean Mérieux – INSERM BSL4 Laboratory.

**Clinical data.** Clinical data were collected from the patients' routine care records. These data, including the virological and biological data, were rendered anonymous and stored in a password-secured Microsoft Access-based database.

**Statistics.** Univariate and multivariate logistical regressions were used to determine the associations between mortality during EVD and the following parameters at admission: age, sex, time between symptom onset and admission, viremia, infectious titers, IL-6, ETC, and presence of *P. falciparum*. A Wilcoxon test was used to compare levels of analytes between EBOV-negative patients and EVD patients in the first 2 days after admission, while ANOVA on ranks test was performed to compare the levels of IL-6 at admission. Statistical analyses were performed with R 3.2.0 software and Sigma Plot 13.0 software (Systat Software). Principal component analysis was performed using the factoextra package under R software. *P* values lower than 0.05 were considered significant.

**Study approval.** This study was approved by the Clinical Research Committee of Institut Pasteur (2015-16), the French Commission Nationale Informatique et Liberté (DR-2016-085; Paris, France), and the Guinean Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé (070/CNERS/15; Conakry, Guinea). As it has not been possible to obtain the written informed consent from patients, an exemption is included in the Guinean Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé agreement.

## Author contributions

S Baize designed the study and drafted the manuscript. S Baize and MAV headed the Macenta laboratory during the study period. S Baize, SR, and AF designed and set up the Macenta laboratory. SR, AF, JS, DP, MM, PL, AP, and TMT performed diagnosis and analyses in the Macenta laboratory. MR, NG, NGB, AIS, PG, CS, SSC, MLDS, SH, BMLA, FP, NS, SS, MK, FRK, CL, and FLH collected clinical data and provided care to patients. CS and JYK headed the Macenta ETC. PZ and SL were in charge of the Macenta ETC pharmacy. LJ was in charge of health promotion and psychological care in the Nzerekore ETC. S Barbe coordinated the Ebola emergency response of Alliance for International Medical Action. BS, TTM, CL, and FLH provided medical expertise. S Baize, SR, and AP performed analyses in the INSERM Jean Mérieux BSL4 Laboratory. JG and MS performed statistical analyses. MAV, S Baize, SR, MR, MK, CL, and FLH analyzed data. All authors contributed to revising the manuscript.

## Acknowledgments

This work was supported by funding from the French Ministry of Foreign Affairs, the Agence Française de Développement, and Institut Pasteur. We thank the Guinean Health Authorities in Conakry and Macenta and, particularly, S. Keita and L. Koivogui. We thank the French Embassy in Conakry for its help and, in

particular, B. Cochery, R. Migliani, O. Buchbinder, R. Devouge, and P. Gibelot. We thank C. Taron-Brocard and C. Schmit (French Ministry of Foreign Affairs). We also thank C. Batejat (Environment and Infectious Risk Unit, Institut Pasteur) for training staff; M. Jouan, A. Granier-Blanc, K. Victoir, and M. Rabenoro (International Division, Institut Pasteur); and C. Rousseau (Purchase Department, Institut Pasteur). We are also particularly grateful to all the staff that worked in the Laboratoire Pasteur du CTE de Macenta from November 2014 to December 2015, including M. Poivogui in particular. We thank Z. Koivogui, M. Keita, S. Berete, C.M. Loua, R. Lolamou, A. Soumah, S. Condé, and M. Condé for their involvement in the collection of samples and data and care of patients. Finally, we thank the French Red Cross staff from Paris, Conakry, and Macenta for logistics.

Address correspondence to: Sylvain Baize, Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur, 21 avenue Tony Garnier, 69365 Lyon cedex 07, France. Phone 33.4.37.28.24.40; E-mail: sylvain.baize@pasteur.fr.

1. Baize S, et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2014;371(15):1418–1425.
2. Baize S. Ebola virus in West Africa: new conquered territories and new risks-or how I learned to stop worrying and (not) love Ebola virus. *Curr Opin Virol*. 2015;10:70–76.
3. Rollin PE, Bausch DG, Sanchez A. Blood chemistry measurements and D-Dimer levels associated with fatal and nonfatal outcomes in humans infected with Sudan Ebola virus. *J Infect Dis*. 2007;196 Suppl 2:S364–S371.
4. Cournac JM, et al. Rhabdomyolysis in Ebola Virus Disease. Results of an Observational Study in a Treatment Center in Guinea. *Clin Infect Dis*. 2016;62(1):19–23.
5. Hunt L, et al. Clinical presentation, biochemical, and haematological parameters and their association with outcome in patients with Ebola virus disease: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(11):1292–1299.
6. Schibler M, et al. Clinical features and viral kinetics in a rapidly cured patient with Ebola virus disease: a case report. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(9):1034–1040.
7. Lyon GM, et al. Clinical care of two patients with Ebola virus disease in the United States. *N Engl J Med*. 2014;371(25):2402–2409.
8. Schieffelin JS, et al. Clinical illness and outcomes in patients with Ebola in Sierra Leone. *N Engl J Med*. 2014;371(22):2092–2100.
9. WHO Ebola Response Team. Ebola virus disease in West Africa--the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1481–1495.
10. Bah EI, et al. Clinical presentation of patients with Ebola virus disease in Conakry, Guinea. *N Engl J Med*. 2015;372(1):40–47.
11. Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol*. 2006;5(2):5.
12. Gignoux E, et al. Effect of artesunate-amodiaquine on mortality related to Ebola virus disease. *N Engl J Med*. 2016;374(1):23–32.
13. Takahashi S, et al. Reduced vaccination and the risk of measles and other childhood infections post-Ebola. *Science*. 2015;347(6227):1240–1242.
14. Walker PG, White MT, Griffin JT, Reynolds A, Ferguson NM, Ghani AC. Malaria morbidity and mortality in Ebola-affected countries caused by decreased health-care capacity, and the potential effect of mitigation strategies: a modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(7):825–832.
15. Plucinski MM, et al. Effect of the Ebola-virus-disease epidemic on malaria case management in Guinea, 2014: a cross-sectional survey of health facilities. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(9):1017–1023.
16. Barry M, et al. Clinical predictors of mortality in patients with Ebola virus disease. *Clin Infect Dis*. 2015;60(12):1821–1824.
17. Rosenke K, et al. Plasmodium parasitemia associated with increased survival in Ebola virus-infected patients. *Clin Infect Dis*. 2016;63(8):1026–1033.
18. Li J, et al. Age and Ebola viral load correlate with mortality and survival time in 288 Ebola virus disease patients. *Int J Infect Dis*. 2016;42:34–39.
19. Lado M, et al. Clinical features of patients isolated for suspected Ebola virus disease at Connaught Hospital, Freetown, Sierra Leone: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(9):1024–1033.
20. Sissoko D, et al. Experimental Treatment with Favipiravir for Ebola Virus Disease (the JIKI Trial): A Historically Controlled, Single-Arm Proof-of-Concept Trial in Guinea. *PLoS Med*. 2016;13(3):e1001967.
21. Lanini S, et al. Blood kinetics of Ebola virus in survivors and nonsurvivors. *J Clin Invest*. 2015;125(12):4692–4698.
22. Sow MS, et al. New evidence of long-lasting persistence of Ebola virus genetic material in semen of survivors. *J Infect Dis*. 2016;214(10):1475–1476.
23. Deen GF, et al. Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors — Preliminary Report [published online ahead of print October 14, 2015]. *N Engl J Med*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1511410>.
24. Mate SE, et al. Molecular evidence of sexual transmission of Ebola virus. *N Engl J Med*. 2015;373(25):2448–2454.
25. Ksiazek TG, et al. Clinical virology of Ebola hemorrhagic fever (EHF): virus, virus antigen, and IgG and IgM antibody findings among EHF patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis*. 1999;179 Suppl 1:S177–S187.
26. Wolf T, et al. Severe Ebola virus disease with vascular leakage and multiorgan failure: treatment of a patient in intensive care. *Lancet*. 2015;385(9976):1428–1435.
27. Uyeki TM, et al. Clinical management of Ebola virus disease in the United States and Europe. *N Engl J Med*. 2016;374(7):636–646.
28. Chatzizisis YS, Misirli G, Hatzitolios AI, Giannoglou GD. The syndrome of rhabdomyolysis: complications and treatment. *Eur J Intern Med*. 2008;19(8):568–574.
29. Holt SG, Moore KP. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med*. 2001;27(5):803–811.

30. Baize S, et al. Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 2002;128(1):163–168.
31. Leroy EM, et al. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *Lancet.* 2000;355(9222):2210–2215.
32. Villinger F, et al. Markedly elevated levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-alpha, interleukin (IL)-2, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha associated with fatal Ebola virus infection. *J Infect Dis.* 1999;179 Suppl 1:S188–S191.
33. Hutchinson KL, Rollin PE. Cytokine and chemokine expression in humans infected with Sudan Ebola virus. *J Infect Dis.* 2007;196 Suppl 2:S357–S363.
34. Baize S, et al. 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):5890–5903.
35. Cressman DE, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science.* 1996;274(5291):1379–1383.
36. Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res.* 2004;10(4):201–222.
37. Maruo N, Morita I, Shirao M, Murota S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology.* 1992;131(2):710–714.
38. Agarwal N, Pitchumoni CS. Acute pancreatitis: a multisystem disease. *Gastroenterologist.* 1993;1(2):115–128.
39. Kreuels B, et al. A case of severe Ebola virus infection complicated by gram-negative septicemia. *N Engl J Med.* 2014;371(25):2394–2401.

# Lassa virus activates myeloid dendritic cells but suppresses their ability to stimulate T cells

## Short Title: Myeloid dendritic cells response to Lassa virus

Justine Schaeffer<sup>1</sup>, Xavier Carnec<sup>1</sup>, Stéphanie Reynard<sup>1</sup>, Mathieu Mateo<sup>1</sup>, Caroline Picard<sup>1</sup>, Natalia Pietrosemoli<sup>2,3</sup>, Marie-Agnès Dillières<sup>3</sup>, and Sylvain Baize<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unité de Biologie des Infections Virales Emergentes, Institut Pasteur; Centre International de Recherche en Infectiologie (INSERM, CNRS, ENS Lyon, Université Lyon I), Lyon, France

<sup>2</sup> PF2 Plateforme Transcriptome et Epigénome, BioMics, Centre d'innovation et Recherche Technologique, Institut Pasteur, Paris, France

<sup>3</sup> Bioinformatics and Biostatistics Hub, Centre de Bioinformatique Biostatistique et Biologie Intégrative (C3BI, USR 3756, IP CNRS), Institut Pasteur, Paris, France

\* Corresponding author. Email: sylvain.baize@pasteur.fr

### Abstract

Lassa virus (LASV) is responsible for a viral hemorrhagic fever in humans and the death of 3,000 to 5,000 people every year. The immune response to LASV is poorly understood, but type I interferon (IFN-I) and T-cell responses appear to be critical for the host. We studied the response of myeloid dendritic cells (mDC) to LASV, as mDCs are involved in both IFN-I production and T-cell activation. We compared the response of primary human mDCs to LASV and Mopeia virus (MOPV), which is similar to LASV, but non-pathogenic. We showed that mDCs produced substantial amounts of IFN-I in response to both LASV and MOPV. However, only MOPV-infected mDCs were able to activate T cells. More surprisingly, coculture with T cells completely inhibited the activation of LASV-infected mDCs. These differences between LASV and MOPV were mostly due to the LASV nucleoprotein, which has major immunosuppressive properties, but the glycoprotein was also involved. Overall, these results suggest that mDCs may be important for the global response to LASV and play a role in the outcome of Lassa fever.

### Author Summary

Lassa fever is a viral hemorrhagic fever and a major public health issue in West Africa. Lassa virus, the causative agent of Lassa fever, is listed by the World Health Organization as one of the emerging pathogens likely to cause severe outbreaks in the near future. Indeed, there is currently no vaccine and no treatment against Lassa virus. Determinants of Lassa virus high pathogenicity are not completely understood. However, it has been shown that rapid type I interferon response and efficient T cell response were critical to survive Lassa fever.

Dendritic cells are at the crossroads of innate and adaptive immunity. Their direct response to viral infection includes type I interferon production. They can also present viral antigens, initiating the T cell responses. We decided to investigate how dendritic cells respond to Lassa virus to evaluate their importance in the global immune response. We showed that primary human myeloid dendritic cells are activated by Lassa virus infection, and produce type I interferon. However, Lassa virus-infected dendritic cells were not able to activate T cells. We also elucidated the roles of viral proteins in the modulation of dendritic cell responses.

## Introduction

Viral hemorrhagic fevers (VHF) are an important global health problem with a significant yearly death toll. Among VHFs, Lassa fever (LF) is endemic in West Africa, with an estimated 300,000 to 500,000 cases and 3,000 to 5,000 deaths every year [1]. Populations living from Senegal to Nigeria are at risk, which is up to 200 million people [2]. Lassa virus (LASV), the causative agent of LF, is listed by the World Health Organization (WHO) as one of the emerging pathogens likely to cause severe outbreaks in the near future, and for which there are few or no medical countermeasures [3]. There are currently no approved vaccines against LASV, no treatment efficient in endemic areas, and limited knowledge about the pathogenesis of LF.

LASV is an Old-World Arenavirus. This enveloped virus contains two segments of negative strand RNA (S and L) coding for four proteins. The nucleoprotein (NP) and glycoprotein precursor (GPC) are coded by the S segment, the matrix protein (Z) and RNA-dependent RNA polymerase (L) by the L segment. ORFs are coded in ambisense and separated by a hairpin structure containing termination sites.

LF begins as a non-specific febrile illness, indiscernible from multiple diseases more common in West Africa, such as malaria, typhoid, dysentery, arboviruses, etc [4]. LF then progresses to pharyngitis, vomiting, diarrhea, and hemorrhagic symptoms. Hypovolemia, multiple organ failure, and shock syndrome then lead to death [5]. The pathophysiological mechanisms that give rise to these symptoms are still poorly understood, but adverse effects of the immune response are strongly suspected [6]. In humans, only small amounts of neutralizing antibodies are detected late after the disease and the humoral response does not correlate with survival [7]. Recovery from LF appears to be associated with early innate immunity and effective T-cell responses [8]. Studies with non-human primates (NHPs) support this hypothesis, in which the survival of LASV-infected NHPs correlates with the early type I interferon (IFN-I) response and detection of circulating antigen-experienced T cells [9].

Early innate responses and the initiation of T-cell immunity are two properties of dendritic cells (DC). DCs are also important targets of LASV *in vitro* and *in vivo* [10,11]. Among DCs, plasmacytoid dendritic cells (pDC) are highly potent IFN-I producers [12], whereas myeloid dendritic cells (mDC) are specialized in antigen presentation and the induction of T-cell responses [13]. However, mDCs can also produce IFN-I under certain conditions, which can play a crucial role in *in vivo*, as they are more numerous than pDCs [14]. In mice infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV), mDCs are the main source of IFN-I, and such IFN-I production is required for efficient T-cell priming [15]. mDCs may play an important role in LASV infection, as both IFN-I and T-cell responses are important.

We previously showed that LASV replicated in monocyte-derived DCs (moDC) but did not activate them [10]. Here we further investigated the relevance of the escape of LASV from the DC response using another arenavirus, Mopeia virus (MOPV) [16]. MOPV is phylogenetically very close to LASV and has been isolated from *Mastomys natalensis*, the main reservoir of LASV [17]. However, MOPV is non-pathogenic in NHPs and can protect against LASV challenge [18]. No human case of MOPV infection has ever been reported [16]. Comparing MOPV and LASV, two very similar viruses but with different pathogenic potential, is a useful approach to identify immune and viral features involved in LASV pathogenesis. This comparison is used to model the differences between fatal and non-fatal LF *in vitro*. In moDCs, MOPV infection was productive and moderately activated cells [19]. In addition, MOPV-infected moDCs cultured with autologous T cells induced early T-cell activation, strong proliferation, and acquisition of effector, memory, and cytotoxic phenotypes. In contrast, LASV-infected moDCs only induced weak and delayed T-cell responses [20]. These results highlight the differences in the response of moDCs to MOPV and LASV, and their ability to induce T-cell responses. They further emphasize the link between DCs and the global response to LASV.

Nevertheless, recent findings have raised doubts concerning the validity of the moDC model. High dimensional mapping of the DC surface phenotype showed that moDCs do not match any *in vivo* population (DCs from blood, lymphoid organs, or skin) [21]. Thus, moDCs are not phenotypically representative of any DC subset in healthy individuals. Studies on influenza A virus also showed different susceptibility to infection between moDCs and

primary mDCs [22]. In light of these results, we decided to investigate the role of mDCs during LASV infection using our LASV/MOPV comparison model.

We purified primary human mDCs and infected them with MOPV and LASV. mDCs infected with MOPV produced much higher levels of IFN-I than moDCs. Surprisingly, LASV-infected mDCs also produced high levels of IFN-I. Unlike moDCs, mDCs were not productively infected by MOPV or LASV, due to the strong IFN-I response. We further characterized the mDC response using transcriptomic and Luminex-based approaches. These large-scale results showed differences in the global activation of mDCs depending on the virus. We next tested the ability of mDCs to induce T-cell responses. Coculture with autologous T cells modulated the mDC response: MOPV-infected mDCs were more strongly activated when cultured with T cells, whereas activation of LASV-infected mDCs was inhibited. Furthermore, MOPV-infected mDCs induced early activation, proliferation, and cytotoxic responses of T cells. LASV-infected mDCs induced no or little T-cell activation. These results suggest crosstalk between mDCs and T cells, influencing not only T-cell responses but also mDC activation. We generated MOPV/LASV chimeras and tested them in our coculture model to identify viral parameters responsible for the differences between LASV and MOPV.

## Results

### mDCs are activated by MOPV and LASV infection

Previous studies showed that MOPV and LASV induced different IFN-I responses in moDCs [19,23]. We first investigated the kinetics of the IFN-I response to MOPV by mDCs. The synthesis of IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, and IFN $\beta$  mRNAs after MOPV infection started as early as eight hours post-infection (hpi), peaked at 24 hpi, and then decreased to reach the level of that of uninfected cells at 40 hpi (S1A Fig). We detected no TNF $\alpha$  mRNA during MOPV infection. Based on these results, we quantified IFN-I at 24 hpi for the rest of the study.

The synthesis of IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, and IFN $\beta$ , as well as that of IFN $\alpha$ 6 and IFN $\alpha$ 8 mRNA was significantly higher in MOPV-infected mDCs than in uninfected mDCs (Fig 1A). Surprisingly, LASV-infected mDCs also produced high levels of IFN-I, nearly similar to that of MOPV-infected mDCs. The IFN-I response to both viruses was associated with upregulation of the activation molecules CD40, CD80, CD83, and of TRAIL (Fig 1B). Viral titers in supernatants of MOPV- or LASV-infected mDCs decreased over time (Fig 2A, white circles), indicating that mDC infection by MOPV and LASV was not productive. Neither significant levels of transcription nor replication of either virus was detected in cells, as illustrated by the lack of mCherry synthesis in most cells after infection with mCherry-expressing LASV or MOPV (Fig 2B, control condition). However, we observed expression of mCherry in a few MOPV- and LASV-infected mDCs, indicating a low level of viral replication in a minority of mDCs during the two days following infection. We were also able to detect MOPV and LASV genomes both in the culture medium and in the cell pellet 24 hpi, with very low differences between MOPV and LASV, indicating that both viruses are able to enter into mDCs with a similar efficiency (S1B-C Fig). This was confirmed by the low level of MOPV and LASV tagged-Z protein expression detected in mDCs 2 days post-infection (dpi, S2-C Fig). Together, these results suggest that there is no significant difference in the ability of LASV and MOPV to infect mDCs and in the lack of productive infection in these cells.

We investigated the possible relationship between the IFN-I response and the lack of viral replication. We thus inhibited the autocrine and paracrine effects of the IFN-I response with neutralizing antibodies that target the IFN $\alpha$ / $\beta$  receptor (IFNAR), IFN $\alpha$ , and IFN $\beta$ . We treated mDCs with the anti-IFN cocktail and infected them with mCherry-expressing MOPV or LASV. mCherry was detected in the cells (Fig 2B, anti-IFN condition), indicating that both viruses replicated. We confirmed this result by titrating infectious particles in the culture medium. Under the anti-IFN condition, viral titers increased from one to four dpi (Fig 2A, black circles), with curves similar to those of classical replication kinetics of MOPV and LASV. Therefore, neutralizing the IFN-I response was sufficient to establish productive infection in mDCs. We demonstrated that mDCs are *per se* permissive to MOPV and LASV infection, but infection is inhibited by the early and robust IFN-I response.

### **Global state of activation in MOPV- and LASV-infected mDCs**

Our study of mDC responses to MOPV and LASV showed, so far, no significant differences between the two viruses. We thus used large-scale methods to obtain a deeper insight into these responses.

We first focused on molecules released by mDCs in the culture medium using the Luminex assay (Fig 3A). There was significantly more IFN $\alpha$ 2 in the supernatants of MOPV-infected mDCs than those of LASV-infected mDCs. Chemokines (MCP-1, MCP-3, and IP-10) and growth factors (VEGF, G-CSF, and GM-CSF) were produced by MOPV- and LASV-infected mDCs. Many pro-inflammatory cytokines were also upregulated in both MOPV- and LASV-infected mDCs: IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, and TNF $\alpha$ . In our study, IL-6, IL-15, VEGF, and MCP-3 were particularly interesting, because they were produced in higher quantities by LASV-infected than MOPV-infected mDCs.

Next, we used a transcriptomic approach to obtain an overview of mDC gene transcription. The differential expression of genes in MOPV- or LASV-infected mDCs relative to uninfected mDCs is presented in Fig 3B. The central column (MOPV/LASV) corresponds to the differential expression of genes between MOPV-infected mDCs and LASV-infected mDCs. The plotted genes show significant differences in expression between MOPV-infected mDCs and LASV-infected mDCs. Globally, genes up (or down) regulated in MOPV-infected mDCs relative to mock-infected mDCs were also up (or down) regulated in LASV-infected mDCs. However, the fold change of expression was generally higher for MOPV than LASV. Thus, the genes upregulated by MOPV were statistically more highly induced than those by LASV. As expected, many genes differentially regulated between MOPV- and LASV-infected mDCs were related to the immune response: IFN (IFN $\alpha$ 6, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 10, and IFN $\omega$ 1), pro-inflammatory (IL15, IL15RA, SIGLEC7, and AXL), and cell-cell communication (CD101, CD200, HLA-W, MS4A4A, and HOMER3). We also identified genes involved in cell growth and death (Fas, BCL2L14, PRAME, and PID1), adhesion and mobility (SYNPO2, DMD, COL23A1, and VCAM1), or both (ANTXR1, AXL, and SDC2). More surprisingly, metabolic genes were regulated, especially those for lipid metabolism (ELOVL7, SCD5, METRNL, LRP5, APOE, APOC1, and FUCA1), oxidative molecule regulation (SPSB4, DDAH2, and NOXA1), and ionic transport (SLCO5A1, TMEM150C, CLIC2, FAM20C, and TNNI2).

These differences had an important effect on the global activation state. Indeed, various pathways were regulated in LASV- and MOPV-infected mDCs relative to mock-infected mDCs (Fig3C). Most of them were related to the immune response, showing that mDCs responded to both viruses. However, there were substantial differences between MOPV- and LASV-infected mDCs at the pathway level. Immunity-related pathways, such as Pattern Recognition Receptors or RIG-I Like Receptor signaling, were upregulated in MOPV-infected mDCs relative to LASV-infected mDCs (Fig 3C). DC maturation was also upregulated by MOPV relative to LASV. This difference was mostly caused by the upregulation of IFN-I, CD40, CD83, CCR7, IL-6, NF $\kappa$ B (p50), MDA5, and Fas genes in MOPV-infected mDCs, but not LASV-infected mDCs (S1D Fig). Overall, these results highlight differences in the activation state of MOPV- and LASV-infected mDCs.

### **MOPV-infected mDCs, but not LASV-infected mDCs, activate T cells**

DCs are involved in the innate immune response. However, a major role of mDCs *in vivo* is to induce a specific cellular response. We developed a coculture model with mDCs (infected or not) and autologous T cells (CD4 and CD8). In these cocultures, the amount of MOPV and LASV genomes in the culture medium and in the cells decreased over time, suggesting an absence of viral replication (S2A-B Fig). To verify this hypothesis, we stained purified mDCs, purified T cells and mDC-T cocultures for intracellular Z protein. We found no positive T cells (S3 Fig.), indicating that viral particles do not enter CD4 and CD8 T cells. mDCs infected by MOPV and LASV had a detectable level of intracellular Z, but only when cultured without T cells (S2C Fig). Considering the low intensity of the Z staining compared to permissive A549 cells, the detected Z proteins more likely come from internalized particles than from new virions.

We then investigated the response of mDCs using this coculture model. MOPV induced substantial IFN-I and CXCL10 production by mDCs at 24 hpi, whereas LASV did not (Fig 4A). At 2 dpi, IFN-I and CXCL10 were upregulated under both MOPV and LASV conditions (S4A Fig). MOPV-infected mDCs upregulated the activation markers CD40, CD80, CD83, and CD86 (48 hpi), but LASV-infected mDCs did not (Fig 4B). These results were

surprising, as they did not match those obtained with infected mDCs alone (Fig 1). Fig 4C shows the IFN-I response at 24 hpi for MOPV- and LASV-infected mDCs (mDC alone, results from Fig 1A) and mDCs in coculture (mDC-T coculture, results from Fig 4A). Under uninfected conditions, IFN-I mRNA levels were 10-fold lower in coculture than when mDCs were cultured alone. This difference was expected because mRNA levels were normalized to those of GAPDH (present in all cells) and IFN-I is mostly produced by mDCs (10% of the cells). MOPV infection of mDCs induced a 10- (IFN $\alpha$ 1) to 80- (IFN $\alpha$ 2) fold increase in IFN-I production relative to that of mock-infected cells when cocultured with T cells. Remarkably, coculture with T cells completely inhibited IFN-I synthesis by LASV-infected mDCs: alone, IFN-I production was comparable to that of MOPV-infected mDCs, and in coculture it was comparable to that of the mock condition. Altogether, these results show that mDC activation and the IFN-I response to MOPV were increased and prolonged in coculture, whereas activation and the IFN-I response to LASV were reduced and delayed. This suggests crosstalk between mDCs and T cells, which modulate the mDC response to MOPV and LASV.

Lastly, we studied T cell responses in our model using flow cytometry. We quantified CD69, a marker of early T cell activation, 2 dpi (Fig 5A). CD69 was upregulated in both CD4 (Fig 5B) and CD8 (Fig 5C) T cells under conditions of MOPV infection, but not those of LASV infection. By 12 dpi, CD4 and CD8 T cells cultured with MOPV-infected mDCs expressed higher amounts of the cytotoxic molecules perforin and granzyme B (GrzB, Fig 5B-D). Such a cytotoxic phenotype was not induced by LASV-infected mDCs. At 15 dpi, there was slight upregulation of perforin and GrzB after coculture with LASV-infected mDCs, but it was still lower than that for the coculture with MOPV-infected mDCs (S4B-C Fig). Ki67 expression by CD4 and CD8 T cells was also upregulated by MOPV-infected mDCs, suggesting their proliferation. Therefore, MOPV-infected mDCs induced activation, a cytotoxic response, and proliferation of CD4 and CD8 T cells. LASV-infected mDCs poorly activated T cells. We searched for factors that could influence the mDC response at early time points. The MOPV coculture was characterized by upregulation of IFN $\gamma$ , Fas ligand (FasL), IL-15, TNF $\beta$ , and TRAIL (Fig 5E). None of these molecules were upregulated in the LASV coculture, and they may play a role in the modulation of mDC responses. Interestingly, IL-18 was downregulated under conditions of LASV infection relative to those of mock or MOPV infection.

### **The major immunosuppressive properties of LASV are carried by the NP**

After having investigated the differences between the responses of MOPV- and LASV-infected mDCs in coculture, we assessed the role played by viral factors. We designed MOPV/LASV chimeras by swapping the different viral proteins between the viral backbones (Fig 6A). We obtained MOPV in which its GP, NP, or intergenic regions of the S segment (IGRS) were replaced by their LASV counterparts, and the corresponding LASV containing MOPV GP, Z, or IGRS. Successful exchanges of the ORFs were verified by next generation sequencing (S5 Fig) and western blot (S6A Fig). We also included LASV<sub>NP EXON</sub>, an LASV mutant with a non-functional exonuclease domain in its NP (described in [24,25]). As expected, some chimeric viruses displayed a reduced and delayed growth in VeroE6 cells compared to wild type viruses (S6B Fig). The genomes/infectious particles ratio varied between viral stocks, but with the exception of LASV<sub>NP EXON</sub>, differences were rather low (S6B-C Fig).

We tested the chimeras in our mDC-T coculture model. Quantification of the IFN-I response allowed us to segregate the viruses into three groups: MOPV-like, LASV-like, and intermediate. In the MOPV-like group (MOPV<sub>WT</sub>, MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP EXON</sub> and LASV<sub>GP MOPV</sub>), infected mDCs produced large amounts of IFN-I mRNA. In the LASV-like group (LASV<sub>WT</sub>, LASV<sub>Z MOPV</sub> and MOPV<sub>NP LASV</sub>), the IFN-I response was as low as under the uninfected condition. MOPV<sub>IGRS LASV</sub> and LASV<sub>IGRS MOPV</sub>-infected mDCs produced small amounts of IFN-I and were designated as "intermediate". It is worth noticing that mDC activation by the chimeric viruses in mDC-T coculture did not match their attenuation on VeroE6 cells: LASV<sub>NP EXON</sub> and MOPV<sub>NP LASV</sub> were the most attenuated ones, whereas their phenotypes in mDC-T coculture were completely different. These results confirmed that the differences we observed in the responses are due to the activity of viral proteins and not to defects in viral replication and assembly. The viral titers did not detectably increase over time for any of the viruses, even though LASV<sub>WT</sub> titer seemed to decrease more slowly (S6D Fig). Quantification of intracellular viral RNA at 1 and 2 dpi (Fig 6B)

showed an increase in viral RNA for only LASV-like viruses. Inhibition of the IFN-I response appeared to be associated with viral replication, even at low levels, without viral particle release.

Differences identified in the mDC response were also observed in the T-cell response (Fig 7). MOPV-like viruses induced over-expression of CD69, perforin, and GrzB in CD4 (Fig 7A) and CD8 (Fig 7B) T cells. LASV-like viruses did not induce T-cell activation. The intermediate viruses showed low-level overexpression of CD69, perforin, and GrzB. The T-cell response correlated with the IFN-I response of mDCs in coculture.

This approach provided useful information on the immunogenic/immunosuppressive properties of viral proteins. MOPV Z protein did not alter the ability of LASV to escape from or suppress mDC and T-cell responses. Exchanging the IGRS between LASV and MOPV partially reversed their phenotype, suggesting that MOPV IGRS is more immunogenic than LASV IGRS. However, the immunogenicity of IGRS was not sufficient to explain the differences between MOPV<sub>WT</sub> and LASV<sub>WT</sub>. LASV GP did not appear to have immunosuppressive properties, as MOPV<sub>GP LASV</sub> exhibited a MOPV-like phenotype. In contrast, MOPV GP was sufficient to render LASV as immunogenic as MOPV. This immunogenicity was associated with the lack of viral replication of LASV<sub>GP MOPV</sub> (Fig 6B). The most striking result of this experiment was the role of the NP. MOPV<sub>NP LASV</sub> behaved as LASV<sub>WT</sub>, showing that LASV NP was sufficient to completely abolish MOPV immunogenicity. The fact that LASV<sub>NP ExoN</sub> was as immunogenic as MOPV suggests that the immunosuppressive properties of LASV NP require a functional exonuclease domain.

In summary, we showed that the inhibition of mDC and T-cell activation by LASV requires the expression of a functional NP with exonuclease properties. Our results also suggest that MOPV GP affects the ability of LASV to replicate in cells, influencing its immunogenicity. Finally, MOPV and LASV IGRS had different immunogenic properties.

## Discussion

We investigated the immune response parameters involved in the control of LASV infection or possibly associated with severe disease and death by studying the response of primary human mDCs to LASV and MOPV. We used MOPV infection to model non-fatal LF, as MOPV is very closely related to LASV, but non-pathogenic in humans [10,19,20,23]. We showed that mDCs were activated, acquired a mature phenotype (CD83 expression), and produced high levels of IFN-I mRNA in response to both MOPV and LASV infection. mDC activation was associated with detection of viral genomes on and/or inside the cells, but not with a significant productive infection. These results were surprising, as MOPV is much more immunogenic than LASV. Previous studies showed that moDCs, which are often used as a model for mDCs, produced moderate amounts of IFN-I in response to MOPV, but not LASV infection [10,19]. In addition, moDCs were productively infected by MOPV and LASV, whereas mDCs were not. This difference is consistent with the fact that LASV replication in LPS-matured moDC was lower than that in immature cells [10]. We also demonstrated that the IFN-I response of mDCs to both viruses was sufficient to explain the absence of productive infection.

We then conducted a large-scale study to exhaustively assess mDC responses to MOPV and LASV. We identified cytokines produced by MOPV- and LASV-infected mDCs, most which are found in patients with terminal VHF [26]. Five of these proteins were produced in different amounts by MOPV-infected and LASV-infected mDCs: IFN $\alpha$ 2, IL-6, IL-15, VEGF, and MCP-3. IFN $\alpha$ 2 levels were significantly higher in MOPV-infected mDCs than LASV-infected cells. This result was consistent with the non-significant differences observed in IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 6, and IFN $\alpha$ 8 mRNA levels between MOPV- and LASV-infected mDCs. The other four proteins were produced in higher amounts during LASV infection. IL-6 is known to be associated with severe cases of VHF [27] and IL-15 production has been correlated with severe cases in CCHF patients [28]. VEGF has been associated with plasma leakage and severity in dengue hemorrhagic fever [29], and MCP-3 has recently been described in Ebola virus-infected NHPs [30]. These factors could all have a role in the pathogenesis of LF, even though DCs are not necessarily the main cell type producing them *in vivo*.

MOPV infection strongly altered the transcriptomic state of mDCs. Most of the genes up (or down) regulated during MOPV infection were also up (or down) regulated during LASV infection, but at much lower levels. Many genes differentially regulated between MOPV- and LASV-infected mDCs were linked to immunity. We also identified genes involved in cell mobility and survival and, more surprisingly, ion and lipid metabolism. The relationship between lipids and VHF has been highlighted in other studies: lipids in serum are associated with febrile illness in LF patients [31] and the LXR/RXR pathway, which integrates lipid metabolism and immune functions, is necessary for dengue virus replication [32]. These differentially regulated genes had an impact on a larger scale: pathways linked to the innate immune response, such as PRR recognition, RIG-I like receptors, PI3K signaling, and DC maturation, were significantly upregulated in MOPV-mDCs relative to LASV-infected mDCs. The regulation of these pathways mostly relied on the same set of genes, including IFN-I, NFκB, CD40, and CD80. Such pathway analysis showed that regulated genes had an important effect on the global activation state of the cells. The main observation was that immunity-related genes and pathways were more highly up-regulated during MOPV infection than LASV infection. Altogether, the differences in transcriptomic regulation confirmed the higher immunogenicity of MOPV than LASV.

*In vivo*, the ability of mDCs to induce specific T-cell responses could be critical during LASV infection. Indeed, the control of LF seems to rely mostly on robust T-cell responses [9,33]. We developed a mDC/T cell coculture system to measure the immunogenicity of MOPV- and LASV-infected mDCs through their ability to induce specific T-cell responses. When cultured with T cells, neither MOPV nor LASV infection seemed to be productive. However, the presence of T cells affected the amount of Z detected inside mDCs 2 to 8 dpi. Our hypothesis is that interaction with T cells accelerated the recycling of major histocompatibility complexes, and therefore the degradation of viral antigens. In this system, MOPV-infected mDCs produced even higher amounts of IFN-I than alone and induced T cell activation, proliferation, and acquisition of a cytotoxic phenotype. On the contrary, LASV-infected mDCs were not activated, did not produce IFN-I, and poorly activated T cells. These differences in T-cell activation are similar to those observed for moDCs. However, mDCs appeared to be much more immunogenic than moDCs: a single stimulation with mDCs was sufficient to activate T cells, whereas multiple stimulation with moDCs were required [20]. Therefore, moDCs are a relevant model to study T-cell activation in the context of MOPV and LASV infection, but not the innate immune response. In this study, T cells primed with MOPV-infected moDCs acquired the ability to specifically release GrzB in the presence of MOPV-infected cells, controlling viral replication [20]. Although we were unable to test this in our model, T cells expressing GrzB and perforin probably had the ability to lyse MOPV-infected cells. Indeed, naïve T cells do not contain cytotoxic granules. GrzB and perforin expression only occur after TCR stimulation and T-cell proliferation [34,35]. T cells primed with MOPV-infected mDCs expressed GrzB and perforin and were thus most likely fully functional cytotoxic T cells. The robust and efficient T-cell responses induced by MOPV-infected mDCs may result from the strong observed transcriptional activation of mDCs. In contrast, LASV-infected mDCs showed lower, but significant, activation and failed to induce the activation and proliferation of T cells. These observations correlate with the high immunogenicity and non-pathogenicity of MOPV, and low immunogenicity and high pathogenicity of LASV.

T cells potentiated the activation of MOPV-infected mDCs, resulting in a 10-fold increase in IFNα release relative to that of mDCs alone. On the contrary, T cells had an inhibitory effect on LASV-infected mDCs, abrogating the synthesis of IFN-I mRNA and the expression of co-stimulatory molecules observed in LASV-infected mDCs. This suggests early crosstalk between mDCs and T cells, resulting in bilateral activation during MOPV-infection and mDC suppression during LASV-infection. The crosstalk between mDCs and T cells could occur through direct contact or soluble mediators. IFNγ, IL-15, TNFβ, FasL, and TRAIL mRNA were overexpressed in the presence of MOPV-infected cells relative to uninfected and LASV-infected cells. These molecules, mainly released by activated T cells, may have been involved in the strengthening of mDC and T cell activation. However, NK cells could have participated in the release of IFNγ and TRAIL, as these cells were still present in the cultures. In the presence of LASV, the level of these T cell-derived mRNAs did not increase. Levels of IL-18, an APC-derived

cytokine, were even significantly lower, confirming the inhibition of the mDC response to LASV. Further studies are needed to identify the mechanism involved in this negative activation loop between mDCs and T cells. We generated MOPV/LASV chimeras to identify viral parameters responsible for the differences in T cell activation by MOPV- and LASV-infected mDCs. MOPV<sub>GP LASV</sub>, LASV<sub>NP Exon</sub>, and LASV<sub>GP MOPV</sub> showed similar immunogenicity as MOPV<sub>WT</sub>. LASV<sub>Z MOPV</sub> and MOPV<sub>NP LASV</sub> were as poorly immunogenic as LASV<sub>WT</sub>. MOPV<sub>IGRS LASV</sub> and LASV<sub>IGRS MOPV</sub> displayed an “intermediate” phenotype. The segregation of viruses in these three phenotypes did not correlate with their attenuation on VeroE6, cells, so the activation of mDC-T cocultures by the chimeras cannot be explained by assembly defects. The “LASV-like” viruses were the only ones that showed productive infection. The low activation of mDCs and limited production of IFN-I probably allowed some viral replication, which was still quickly controlled 2 dpi when IFN-I was synthesized. The impact of the IGRS on immunogenicity presumably relied on a difference of structure: the MOPV IGRS has a duplicated hairpin structure, whereas that of LASV has only one [36]. The double hairpin is most likely a better stimulator of intracellular sensors than a single hairpin, and thus more immunogenic. This could explain the intermediate phenotype of IGRS chimeras. Nevertheless, this difference between their IGRS was not sufficient to explain the differences in immunogenicity between MOPV<sub>WT</sub> and LASV<sub>WT</sub>, confirming that recognition by intracellular sensors is not the only mechanism involved. We also showed that MOPV Z protein was not a modulator of immunogenicity. We were unable to test LASV Z properties in our model, as MOPV<sub>Z LASV</sub> was not viable. However, the removal of LASV Z did not affect LASV immunogenicity, indicating that it does not have major immunosuppressive properties. Previous studies suggested that the Z protein of some arenaviruses is able to bind RIG-I and inhibit its signaling, resulting in an inhibition of IFN-I response. One of this study showed that the Z proteins of New World arenaviruses, but not Old World arenaviruses, inhibit RIG-I signaling, which is coherent with our findings [37]. A more recent study concluded that only the Z proteins of pathogenic arenaviruses, including Old World arenaviruses, present this immunosuppressive function, suggesting that LASV Z (but not MOPV Z) is immunosuppressive [38]. However, we did not find in our mDC model any evidence for an immunosuppressive role of either LASV or MOPV Z protein. These discrepancies could be due to the use of different models. Indeed, additional sensors other than RIG-I could contribute for type I IFN synthesis in response to arenavirus infection in human mDC and therefore could conceal the effect of LASV Z protein on RIG-I. MDA5 would be a possible candidate for such an hypothesis. LASV GP did not appear to have major immunosuppressive properties. Indeed, MOPV<sub>GP LASV</sub> was almost as immunogenic as MOPV and did not replicate. In contrast, LASV became as immunogenic as MOPV when it expressed MOPV GP. It is possible that MOPV and LASV GP address virions to different cellular compartments, influencing their ability to escape or trigger innate immunity and, consequently, viral replication. Their possible use of different fusion receptors, Lamp1 for LASV and unidentified for MOPV, may also be involved [39]. We are currently investigating this possibility. Finally, our results showed that LASV NP was sufficient to abolish the immunogenicity of MOPV-infected mDCs. This shows that LASV NP has major immunosuppressive properties, which require its exonuclease domain. The immunosuppressive properties of arenavirus NP, especially of its exonuclease domain, have already been largely described. This domain is required for LASV NP to inhibit the IRF pathway [40]. LASV detection by RIG-I is inhibited through the digestion of double-stranded RNA by LASV NP, and this mechanism is probably conserved among most arenaviruses [25,41,42]. However, the discrepancy between the ability of MOPV and LASV to modulate immunogenicity is surprising, as both NPs contain an active exonuclease domain [43]. It is possible that the exonuclease activity of LASV NP is more potent than that of MOPV. Another possibility is that the digestion of dsRNA is not the only function of this domain. The ability of LASV NP to bind IKKε may be involved, as this interaction is associated with the exonuclease domain [44]. LASV NP also interacts with the PACT complex, inhibiting PACT-dependent activation of RIG-I [45]. This interaction is abolished when the exonuclease domain is mutated. NP-PACT interaction has been shown for Junin, Machupo, Tacaribe and Pichinde, but MOPV was not included in this study. Other cellular proteins interacting with LASV NP have been identified, but not yet described, and could be involved in its immunosuppressive properties [46]. Unfortunately, it was not possible to study the impact of MOPV NP on LASV immunogenicity, because LASV<sub>NP MOPV</sub> was not viable.

In conclusion, this *ex vivo* approach showed that primary human mDCs respond well to both MOPV and LASV. However, only MOPV-infected mDCs were activated and able to induce T-cell responses when cultured with T cells. We demonstrated that NP and GP are viral factors involved in the respective immunogenic and immunosuppressive properties of MOPV and LASV. Duplicated hairpins in the S segment, different cell addressing by GP, and less efficient immunosuppressive factors, such as NP, may result in efficient triggering of RNA sensors by MOPV, explaining its strong immunogenicity. In contrast, multiple and efficient immunosuppressive mechanisms, mediated by NP and Z, and a lower ability of viral RNA to stimulate cell receptors are probably responsible for the poor immunogenicity of LASV. The comparison of LASV and MOPV is used to model the differences between fatal and non-fatal LF *in vitro*. *In vivo*, the factors that determine the outcome of LF are still unknown. Factors involved in different mDC responses are good candidates, as mDCs may initiate the entire immune response in humans. Host polymorphisms, initial viral load, and the route of infection may affect LASV replication in mDCs, the detection of LASV by intracellular sensors, and the inhibition of mDC activation by viral proteins. Such factors would be critical for the survival of the host, as modulating the mDC response would influence the initiation of T-cell responses.

## Methods

### Virus and cells

VeroE6 cells were grown in DMEM supplemented with 0.5% penicillin-streptomycin and 5% fetal bovine serum (FBS, all from Invitrogen). A549 cells were grown in DMEM supplemented with 0.5% penicillin-streptomycin, 5% FBS and 1% HEPES (all from Invitrogen). Mopeia (AN21366 strain [16]) and Lassa (AV strain [47]) viruses were grown in VeroE6 cells at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub>. Viral supernatants were harvested and used as the virus stock and the absence of mycoplasma was confirmed. LASV and MOPV titers were determined by plaque immunoassays as described below. All experiments with LASV were carried out in biosafety level 4 facilities (Laboratoire P4 Jean Merieux-Inserm, Lyon).

The reverse genetics systems of LASV and MOPV rely on a four-plasmid strategy, as described in [24], with the rescue procedure of recombinant viruses. Lassa virus with a non-functional exonuclease domain (LASV<sub>NP Exon</sub>) was also obtained by reverse genetics and its characteristics are described in [24,25]. We obtained LASV and MOPV chimeras by first generating plasmids coding for the S or L segment and depleted for an ORF (or intergenic region of the S segment, IGRS). Briefly, plasmids encoding the S or L segment were amplified with primers, (i) allowing the complete amplification of the plasmid, except the target ORF and (ii) flanked with BsmBI restriction sites downstream of the start and upstream of the stop codons of the deleted ORF. PCR products were ligated and depleted segments used for the cloning of the heterologous ORF (or IGRS).

LASV-mCh and MOPV-mCh were modified to express the mCherry and LASV/MOPV NP proteins from a single gene. We used plasmids coding for the S segment of LASV or MOPV with a depleted NP (as described above). An insert containing the mCherry and NP ORFs, separated by a P2A self-cleavage site, was generated by overlapping PCR. This insert was cloned into the LASV $\Delta$ NP or MOPV $\Delta$ NP plasmid. MOPV and LASV with a FLAG-tagged Z protein were also obtained by reverse genetics. Sequences of all plasmid constructs were verified by sequencing.

### IFN-I neutralization

Autocrine and paracrine effects of the IFN-I response were neutralized (Fig2) by treating mDCs with cocktails of neutralizing antibodies. The anti-IFN cocktail contained antibodies neutralizing IFNAR (MMHAR-2, 5  $\mu$ g/mL), IFN $\alpha$  (MMHA-2, 2.5  $\mu$ g/mL), and IFN $\beta$  (MMHB-3, 2.5  $\mu$ g/mL), all from PBL Assay Science. In the control condition, the cocktail contained corresponding control isotype antibodies, IgG1 (5  $\mu$ g/mL) and IgG2a (5  $\mu$ g/mL), both from ThermoFisher Scientific. One dose of antibody cocktail was administered to the cells at the time of infection. Half a dose was added to the cell culture 1 and 3 dpi. Cells were infected at a MOI = 0.1 by wild type or mCherry-expressing MOPV or LASV. For MOPV<sub>WT</sub> and LASV<sub>WT</sub>-infected mDCs, small volumes of supernatant were

harvested at various times post-infection and titrated. For mCherry-expressing MOPV and LASV, mCherry fluorescence was measured by fluorescence microscopy with Leica DMIRB.

### **Virus titration**

Vero cells were infected with sequential dilutions of supernatant and maintained for six days with Carboxymethyl-cellulose (1.6%) (BDH Laboratory Supplies) in DMEM supplemented with 2% FBS. Infectious foci were detected by incubation with monoclonal antibodies directed against MOPV and LASV (mAbs L52-54-6A, L53-237-5 and YQB06-AE05, generously provided by Dr P. Jahrling, USAM-RIID, Fort Detrick, MD), followed by PA-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich).

### **Cell purification**

PBMCs were isolated by Ficoll (GE Healthcare) centrifugation from the blood of consenting healthy donors provided by the Etablissement Français du Sang (Lyon, France). mDCs were isolated by negative selection using the Myeloid Dendritic Cell Isolation kit (Miltenyi Biotech). mDCs were maintained in RPMI 1640 Glutamax I, 0.5% penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 1% nonessential amino acids (full RPMI), and 10% FBS (all from Invitrogen). mDCs were infected at a MOI = 2 or treated with pIC (Invitrogen) at 150 µg/mL for a positive control of activation.

For mDC-T cell coculture, autologous plasma (AP) was heated for 30 min at 56°C and centrifuged for 20 min at 1,200 x g before use. mDCs were isolated from 75 to 80% of the PBMCs (as described above) and T cells from 20 to 25%. For T cells, peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated by centrifugation on 50% Percoll (GE Healthcare) in phosphate-buffered saline (PBS). PBLs were washed three times in full RPMI supplemented with 4% AP. B cells were depleted using CD19 antibodies coupled to immunomagnetic beads (Dyna). T cells and mDCs were maintained overnight in full RPMI supplemented with 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen) and 10% AP. mDCs were harvested and infected at a MOI = 1 for 1 h. Supernatants of uninfected vero cells were used for the mock condition. Infected mDCs were added to T cells at a ratio of one mDC to 10 T-cells.

For intracellular viral staining, purified mDCs, mDC-T coculture and A549 cells were infected with recombinant MOPV and LASV expressing Z-FLAG. mDCs were infected at MOI = 1 and cultures alone or with T cells at a ratio of one mDC to 10 T-cells. A549 cells were infected at MOI = 0.1.

Replicates of all experiments were performed with blood from different donors.

### **RT-qPCR**

To quantify cellular mRNA, cells were harvested and centrifuged. RNA from the cell pellets were extracted using the RNeasy kit and DNase I digestion (both from Qiagen), followed by a second DNase digestion (Ambion). cDNAs were randomly reverse transcribed using SuperScript® III reverse transcriptase, Oligo (dT) 12-18 primers, and RNase OUT™ ribonuclease inhibitors (all from Invitrogen). Cellular genes expression was assessed using the Taqman Universal master mix and Taqman commercial primers and probes for FasL, IFNα6, IFNα8, IFNγ, IL-15, IL-18, TNFα, TNFβ, TRAIL, and CXCL10 (Life Technologies). For the IFN-I genes, we used the following primers and probes: 5'-GTGGTGCTCAGCTGCAAGTC-3' (sense), 5'-TGTGGGTCTCAGGGAGATCAC-3' (antisense) and 5'-AGCTGCTCTCTGGGC-3' (probe) for IFNα1 ; 5'-CAGTCTAGCAGCATCTGCAACAT-3' (sense), 5'-GGAGGGCCACCAGTAAAGC-3' (antisense) and 5'-ACAATGGCCTTGACCTT-3' (probe) for IFNα2 ; 5'-TCTCCACGACAGCTCTTCCA-3' (sense), 5'-ACACTGACAATTGCTGCTTCTTG-3' (antisense) and 5'-AACTTGCTTGATTCT-3' (probe) for IFNβ. GAPDH mRNAs were amplified using commercial primers and probes (Applied Biosystems) to normalize the results. Relative mRNA levels were calculated as  $2^{-\Delta Ct}$ , with Ct the cycle threshold and  $\Delta Ct = [\text{gene Ct}] - [\text{GAPDH Ct}]$ .

For viral genome quantification, viral RNAs were extracted from culture supernatants using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Viral genomes were quantified using the EurobioGreen qPCR Mix Lo-ROX (Eurobio). Primers targeted MOPV NP (5'-CTTTCCCTGGCGTGTCA-3' and 5'-GAATTTGAAGGCTGCCTTGA-3') or LASV NP (5'-CTCTACCCGGAGTATCT-3' and 5'-CCTCAATCAATGGATGGC-3'). We transcribed the pGEM plasmid, coding for fragments of the MOPV and LASV NP gene (including the sequence amplified by PCR), *in vitro*, using the Riboprobe *in vitro* Transcription System (Promega), to obtain RNA standards. Viral genomes were quantified (by

copy number) by comparing our samples with sequential dilutions of these standards. All runs were performed in duplicate using a LightCycler480 (Roche).

### **Transcriptomics**

mDCs were infected at a MOI = 1 by LASV or MOPV or were uninfected and incubated for 24 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were centrifuged and RNA from the cell pellets extracted using the RNeasy kit and DNase I digestion (both from Qiagen), followed by a second DNase digestion (Ambion). Experiments were replicated three times with cells from different donors. RNA quantity and quality were assessed using the Agilent RNA 6000 nano kit and 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Transcriptome sequencing and bioinformatic analyses were performed by GATC (Constance, Germany). cDNAs were synthesized by random priming of poly-A RNAs. Pair-end, 2x50 bp read-length illumina sequencing was performed on cDNA libraries, with a minimum of 30 million read pairs per sample. Pathway analysis was performed with Ingenuity Pathway Analysis software (QIAGEN) and heatmaps were made using R.

### **Flow Cytometry**

For mDC activation, mDCs were harvested 24 hpi, washed, and the pellets suspended in PBS complemented with 5% pooled human plasma. We incubated cells for 30 min at 4°C with Lin1-FITC, CD83(HB15e)-PE, CD40(5C3)-APC-H7 (BD Biosciences), CD11c(BU15)-PeCy5, CD86(HA5.2B7)-PeCy7, CD80(MAB104)-APC-AlexaFluor®750, HLADR(Immu-357)-KromeOrange (Beckman Coulter), and/or CD253(RIK2.1)-APC (Miltenyi Biotech).

For mDC-T coculture, mDC activation was assessed at 48 hpi (using the same protocol as for mDCs alone). T-cell activation was assessed 2, 12, and 15 dpi. Cells were harvested, washed, and the pellets suspended in PBS complemented with 5% pooled human plasma. We incubated cells for 30 min at 4°C with CD4(SFC112T4D11)-PECy7, CD3(UCHT1)-KromeOrange (Beckman Coulter), CD69(FN50)-PeCy7, CD4(RPA-T4)-AlexaFluor®647, and/or CD8(RPA-T8)-BV421 (BD Biosciences). The expression of intracellular proteins was analyzed by treating the cells with the FoxP3 Staining Buffer Set and FcR Blocking Reagent, human (Miltenyi Biotech), according to the manufacturer's instructions, and incubating them with Perforin(δG9)-FITC, GrzB(GB11)-PE, and/or Ki67(B56)-PerCPCy5.5 (BD Biosciences).

For staining of intracellular virus, purified mDCs and mDC-T cocultures were harvested at 2, 5, and 8 dpi and centrifuged. The cell pellets were suspended in PBS complemented with 5% pooled human plasma and incubated for 30 min at 4°C with Lin1-FITC (BD Biosciences), CD11c(BU15)-PeCy5 and HLADR(Immu-357)-KromeOrange (Beckman Coulter). Cells were treated with the FoxP3 Staining Buffer Set and FcR Blocking Reagent, human (Miltenyi Biotech), according to the manufacturer's instructions, and incubated with anti-DYKDDDDK-APC antibody (Miltenyi Biotech).

The fluorescence of paraformaldehyde-fixed cells was measured using an EPICS-XL flow cytometer (Beckman Coulter). Data were analyzed using Kaluza software (Beckman Coulter, version 1.2). DCs were gated as Lin1<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> cells, and CD11c was used to confirm their phenotype. After phenotypic selection, based on FSC/SSC, CD4 and CD8 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells, respectively. See S7 Fig for more details.

### **Luminex**

mDCs were harvested 24 hpi and the culture medium collected. Fifty cytokines were quantified in the samples using the Milliplex® map kit Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (PX38) and Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel IV (Merck Millipore). Runs were performed with a Magpix® Luminex (Merck Millipore).

### **Western Blot**

VeroE6 cells infected with MOPV and LASV chimeras (MOI = 0.01) were lysed in Laemmli buffer (Bio-Rad) at 4 dpi. Heat-denatured proteins were loaded and separated on 4-15% gradient precast gels and transferred onto PVDF membranes before staining. Samples were immunoblotted with primary antibodies against LASV GP1, LASV NP or LASV/MOPV Z, anti-mouse or anti-rabbit antibody conjugated to peroxidase (Jackson ImmunoResearch) and SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (ThermoFisher Scientific). Actin was used as a control for protein extraction and staining.

## Statistical analysis

The mean and standard error of the mean (SEM) for each set of data were calculated using R. Graphs were generated using SigmaPlot (SyStat Software Inc). Microscopy images were analyzed with AxioVision software (Zeiss, version 4.9).

Results between the various infection conditions (mock, pIC, MOPV, LASV ...) were compared by performing Wilcoxon tests with R. Replication kinetics (in Fig 2B) were compared performing Repeated-Measures ANOVA followed by All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) using SigmaPlot. Differences between two sets of data were considered to be significant for  $p < 0.05$ .

## Acknowledgements

Most experiments were conducted in the Laboratoire INSERM-Jean Merieux BSL4 facility. We are very grateful to all the BSL-4 team members for the help provided throughout this work. We thank the members of the HUB (Institut Pasteur) for the organisation of bioinformatics training. We thank C. Clegg and G. Lloyd (Public Health England, Porton Down, Salisbury, United Kingdom) for the MOPV, S. Becker for the AV strain of LASV, and the Etablissement Français du Sang for providing human blood. We thank T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, and P. Jahrling for LASV MAbs. We thank M. Bouloy, R. Flick, T. Fujita (Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto, Japan) and Luiz Martinez-Sobrido (University of Rochester, Rochester, NY, USA) for the tools used to develop the LASV and MOPV reverse genetics systems.

## References

1. Ogbu O, Ajuluchukwu E, Uneke CJ. Lassa fever in West African sub-region: an overview. *J Vector Borne Dis.* 2007;44: 1–11.
2. Fichet-Calvet E, Ölschläger S, Strecker T, Koivogui L, Becker-Ziaja B, Camara AB, et al. Spatial and temporal evolution of Lassa virus in the natural host population in Upper Guinea. *Sci Rep.* 2016;6: 21977. doi:10.1038/srep21977
3. WHO. WHO publishes list of top emerging diseases likely to cause major epidemics. In: <http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/>. 2015.
4. Hartnett JN, Boisen ML, Oottamasathien D, Jones AB, Millett MM, Nelson DS, et al. Current and emerging strategies for the diagnosis, prevention and treatment of Lassa fever. *Future Virol.* 2015;10: 559–584. doi:10.2217/fvl.15.41
5. Basler CF. Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Semin Immunopathol.* 2017;39: 551–561. doi:10.1007/s00281-017-0637-x
6. Walker DH, McCormick JB, Johnson KM, Webb PA, Komba-Kono G, Elliott LH, et al. Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *Am J Pathol.* 1982;107: 349–56.
7. Vela E, Eric. Animal Models, Prophylaxis, and Therapeutics for Arenavirus Infections. *Viruses.* 2012;4: 1802–1829. doi:10.3390/v4091802
8. Russier M, Pannetier D, Baize S. Immune responses and Lassa virus infection. *Viruses.* 2012;4: 2766–85. doi:10.3390/v4112766
9. Baize S, Marianneau P, Loth P, Reynard S, Journeaux A, Chevallier M, et al. Early and strong immune responses are associated with control of viral replication and recovery in lassa virus-infected cynomolgus monkeys. *J Virol.* 2009;83: 5890–903. doi:10.1128/JVI.01948-08
10. Baize S, Kaplon J, Faure C, Pannetier D, Georges-Courbot M-C, Deubel V. Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J Immunol.* 2004;172: 2861–9.
11. Hensley LE, Smith MA, Geisbert JB, Fritz EA, Daddario-DiCaprio KM, Larsen T, et al. Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *Viol J.* 2011;8: 205. doi:10.1186/1743-422X-8-205

12. Barchet W, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity. *Semin Immunol.* 2005;17: 253–261.
13. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140: 22–30. doi:10.1111/imm.12117
14. Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin J-J, Brière F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol.* 2003;171: 6466–77. doi:10.4049/JIMMUNOL.171.12.6466
15. Hervas-Stubbs S, Riezu-Boj J-I, Mancheño U, Rueda P, Lopez L, Alignani D, et al. Conventional but Not Plasmacytoid Dendritic Cells Foster the Systemic Virus-Induced Type I IFN Response Needed for Efficient CD8 T Cell Priming. *J Immunol.* 2014;193: 1151–61. doi:10.4049/jimmunol.1301440
16. Wulff H, McIntosh BM, Hamner DB, Johnson KM. Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in south-east Africa. *Bull World Health Organ.* 1977;55: 441–4.
17. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. Phylogenetic Analysis of the Arenaviridae : Patterns of Virus Evolution and Evidence for Cospeciation between Arenaviruses and Their Rodent Hosts. *Mol Phylogenet Evol.* 1997;8: 301–316.
18. Fisher-Hoch SP, Hutwagner L, Brown B, McCormick JB. Effective Vaccine for Lassa Fever. *J Virol.* 2000;74: 6777–6783. doi:10.1128/JVI.74.15.6777-6783.2000
19. Pannetier D, Faure C, George-Courbot M-C, Deubel V, Baize S. Human Macrophages , but Not Dendritic Cells , Are Activated and Produce Alpha / Beta Interferons in Response to Mopeia Virus Infection. *J Virol.* 2004;78: 10516–24. doi:10.1128/JVI.78.19.10516
20. Pannetier D, Reynard S, Russier M, Journeaux A, Tordo N, Deubel V, et al. Human dendritic cells infected with the nonpathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than those infected with Lassa virus. *J Virol.* 2011;85: 8293–306. doi:10.1128/JVI.02120-10
21. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, Engleman EG, Keler T, Marinkovich MP, et al. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity.* 2017;47: 1037–1050. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.001
22. Baharom F, Thomas S, Bieder A, Hellmér M, Volz J, Sandgren KJ, et al. Protection of human myeloid dendritic cell subsets against influenza A virus infection is differentially regulated upon TLR stimulation. *J Immunol.* 2015;194: 4422–30. doi:10.4049/jimmunol.1402671
23. Baize S, Pannetier D, Faure C, Marianneau P, Marendat I, Georges-Courbot M-C, et al. Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes Infect.* 2006;8: 1194–202. doi:10.1016/j.micinf.2006.02.002
24. Carnec X, Baize S, Reynard S, Diancourt L, Caro V, Tordo N, et al. Lassa virus nucleoprotein mutants generated by reverse genetics induce a robust type I interferon response in human dendritic cells and macrophages. *J Virol.* 2011;85: 12093–7. doi:10.1128/JVI.00429-11
25. Reynard S, Russier M, Fizet A, Carnec X, Baize S. Exonuclease domain of the Lassa virus nucleoprotein is critical to avoid RIG-I signaling and to inhibit the innate immune response. *J Virol.* 2014;88: 13923–7. doi:10.1128/JVI.01923-14
26. Geisbert TW, Jahrling PB. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med.* 2004;10: S110-21. doi:10.1038/nm1142
27. Bray M. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Curr Opin Immunol.* 2005;17: 399–403.
28. Papa A, Tsergouli K, Çağlayık DY, Bino S, Como N, Uyar Y, et al. Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Med Virol.* 2016;88: 21–27. doi:10.1002/jmv.24312
29. Yong YK, Tan HY, Jen SH, Shankar EM, Natkunam SK, Sathar J, et al. Aberrant monocyte responses predict and characterize dengue virus infection in individuals with severe disease. *J Transl Med.* 2017;15: 121. doi:10.1186/s12967-017-1226-4
30. Caballero IS, Honko AN, Gire SK, Winnicki SM, Melé M, Gerhardinger C, et al. In vivo Ebola virus infection leads to a strong innate response in circulating immune cells. *BMC Genomics.* 2016;17: 707.

doi:10.1186/s12864-016-3060-0

31. Gale T V, Horton TM, Grant DS, Garry RF. Metabolomics analyses identify platelet activating factors and heme breakdown products as Lassa fever biomarkers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11: e0005943. doi:10.1371/journal.pntd.0005943
32. Sierra B, Triska P, Soares P, Garcia G, Perez AB, Aguirre E, et al. OSBPL10, RXRA and lipid metabolism confer African-ancestry protection against dengue haemorrhagic fever in admixed Cubans. *PLoS Pathog.* 2017;13: e1006220. doi:10.1371/journal.ppat.1006220
33. ter Meulen J, Badusche M, Kuhnt K, Doetze A, Satoguina J, Marti T, et al. Characterization of human CD4(+) T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein. *J Virol.* 2000;74: 2186–92.
34. Meng Y, Harlin H, O’Keefe JP, Gajewski TF. Induction of cytotoxic granules in human memory CD8+ T cell subsets requires cell cycle progression. *J Immunol.* 2006;177: 1981–7.
35. Kelso A, Costelloe EO, Johnson BJ, Groves P, Buttigieg K, Fitzpatrick DR. The genes for perforin, granzymes A-C and IFN-gamma are differentially expressed in single CD8(+) T cells during primary activation. *Int Immunol.* 2002;14: 605–13.
36. Wilson SM, Clegg JC. Sequence analysis of the S RNA of the African arenavirus Mopeia: an unusual secondary structure feature in the intergenic region. *Virology.* 1991;180: 543–52.
37. Fan L, Briese T, Lipkin WI. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol.* 2010;84: 1785–91. doi:10.1128/JVI.01362-09
38. Xing J, Ly H, Liang Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *J Virol.* 2015;89: 2944–55. doi:10.1128/JVI.03349-14
39. Jae LT, Raaben M, Herbert AS, Kuehne AI, Wirchnianski AS, Soh TK, et al. Virus entry. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science (80- ).* 2014;344: 1506–10. doi:10.1126/science.1252480
40. Hastie KM, King LB, Zandonatti MA, Saphire EO. Structural Basis for the dsRNA Specificity of the Lassa Virus NP Exonuclease. *PLoS One.* 2012;7: e44211. doi:10.1371/journal.pone.0044211
41. Martínez-Sobrido L, Giannakas P, Cubitt B, García-Sastre A, de la Torre JC. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol.* 2007;81: 12696–703. doi:10.1128/JVI.00882-07
42. Shao J, Liang Y, Ly H. Human Hemorrhagic Fever Causing Arenaviruses: Molecular Mechanisms Contributing to Virus Virulence and Disease Pathogenesis. *Pathogens.* 2015;4: 283–306. doi:10.3390/pathogens4020283
43. Carnec X, Matéo M, Page A, Reynard S, Hortion J, Picard C, et al. A vaccine platform against arenaviruses based on a recombinant hyper-attenuated Mopeia virus expressing heterologous glycoproteins. *J Virol.* 2018; doi:10.1128/JVI.02230-17
44. Pythoud C, Rodrigo WWSI, Pasqual G, Rothenberger S, Martínez-Sobrido L, de la Torre JC, et al. Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKε. *J Virol.* 2012;86: 7728–38. doi:10.1128/JVI.00187-12
45. Shao J, Liang Y, Ly H. Roles of Arenavirus Z Protein in Mediating Virion Budding, Viral Transcription-Inhibition and Interferon-Beta Suppression. *Hemorrhagic Fever Viruses Methods in Molecular Biology.* 2018. pp. 217–227. doi:10.1007/978-1-4939-6981-4\_16
46. Loureiro ME, Zorzetto-Fernandes AL, Radoshitzky S, Chi X, Dallari S, Marooki N, et al. DDX3 suppresses type I interferons and favors viral replication during Arenavirus infection. *PLOS Pathog.* 2018;14: e1007125. doi:10.1371/journal.ppat.1007125
47. Günther S, Emmerich P, Laue T, Kühle O, Asper M, Jung A, et al. Imported lassa fever in Germany: molecular characterization of a new lassa virus strain. *Emerg Infect Dis.* 2000;6: 466–76. doi:10.3201/eid0605.000504

**Fig 1. Primary human mDCs are activated by both MOPV and LASV.**

mDCs were cultured for 24 h with culture medium (mock), pIC (150 µg/mL), MOPV, or LASV (MOI = 2). Cells were analyzed by RT-qPCR (A) or flow cytometry (B).

(A) Quantification of IFN-I mRNA is expressed as the gene/GAPDH ratio. (B) mDCs were gated as lineage<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup> and cells positive for activation molecules were counted. The results are expressed as the percentage of positive mDCs normalized over the mock condition. Data shown are the means and SEM of eight independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

**Fig 2. MOPV and LASV infection of mDCs is inhibited by the IFN-I response.**

mDCs were treated with cocktails of neutralizing antibodies 0, 1, and 3 days post-infection (dpi). In the anti-IFN condition, the cocktail contained antibodies neutralizing IFNAR (MMHAR-2, 5 µg/mL), IFN $\alpha$  (MMHA-2, 2.5 µg/mL), and IFN $\beta$  (MMHB-3, 2.5 µg/mL). In the control condition, the cocktail contained corresponding control isotype antibodies, IgG1 (5 µg/mL) and IgG2a (5 µg/mL). (A) mDCs were infected with MOPV or LASV (MOI = 0.1). Small volumes of supernatant were collected from 0 to 6 dpi and viral titers quantified. Data shown are the means and SEM of viral titers from three independent experiments. Statistical significance was assessed by Two-Way Repeated-Measures ANOVA followed by All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method) and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*)

(B) mDCs were infected with mCherry-expressing MOPV or LASV (MOI = 0.1). mCherry fluorescence was measured from 1 to 5 dpi. Images presented here are representative of three independent experiments.

**Fig 3. Activation patterns are different between MOPV- and LASV-infected mDCs.**

(A) mDCs were cultured for 24 h with culture medium (mock), pIC (150 µg/mL), MOPV, or LASV (MOI = 2). Proteins levels were quantified in the culture medium using the Luminex assay. Data shown are the means and SEM of five independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*).

(B-C) mDCs were cultured for 24 h with culture medium (mock), MOPV, or LASV (MOI = 1). Cellular mRNA from three independent experiments was quantified using poly-A amplification and next-generation sequencing. (B) The central column shows differential expression of genes in MOPV relative to LASV (MOPV/LASV). Other data shown are the differential expression of genes in the MOPV and LASV condition relative to mock for independent experiments (1, 2, and 3) or the mean of three experiments (mean). Genes shown in this figure displayed significant differences of expression between the MOPV- and LASV-infected conditions (adjusted  $p < 0.05$ ). (C) Regulation of pathways between mock, MOPV, and LASV conditions was analyzed using Ingenuity Pathway Analysis. Z-scores were computed from the differential expression of significantly regulated genes (adjusted  $p < 0.05$ ): in the MOPV/mock column, a positive Z-score indicates that the pathway is globally upregulated in MOPV-infected mDCs relative to uninfected mDCs.

**Fig 4. The mDC response to MOPV and LASV is modulated by coculture with T cells.**

mDCs were infected with MOPV or LASV or were uninfected and cultured for 24 (A-C) or 48 h (B) with T cells. mDCs were analyzed by RT-qPCR (A-C) or flow cytometry (B).

(A) Quantification of IFN-I and CXCL10 mRNA is expressed as the gene/GAPDH ratio. (B) mDCs were gated as lineage<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup>, and cells positive for activation molecules counted. Results are expressed as the percent of positive mDCs normalized over the mock condition. Data shown are the means and SEM of seven independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*). (C) Results of the IFN-I response in mDC-T cell coculture (presented in Figure 4A) compared to those for infected mDCs (from Fig 1A). mDCs represented only 10% of total cells expressing GAPDH in mDC-T cell cocultures, but were the main cell type expressing IFN-I.

**Fig 5. MOPV-infected mDCs, but not LASV-infected mDCs, induce T-cell activation and a cytotoxic response.**

mDCs were infected with MOPV or LASV (MOI = 1) or were uninfected and cultured with T cells for 1, 2, or 12 days (see indications on graphs). T cells were analyzed by flow cytometry (A-B-C-D) or RT-qPCR (E).

(A) Dot plot showing expression of CD69 in CD3<sup>+</sup> cells 2 dpi. CD8<sup>+</sup> cells correspond to CD8 T cells and CD8<sup>-</sup> cells to CD4 T cells. (B) Distribution of GrzB expression in CD8 T cells (CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) 12 dpi. Data shown are of one experiment representative of seven replicates.

(C-D) CD4 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells (C) and CD8 T cells as CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (D). Cells positive for activation molecules were counted. Results are expressed as the percentage of positive CD4 (C) or CD8 (D) T cells. Data shown are the means and SEM of seven independent experiments. (E) Quantification of mRNA is expressed as the gene/GAPDH ratio. Data shown are means and SEM of four independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.01$  (\*\*).

**Fig 6. Exchanging viral proteins between MOPV and LASV modifies mDC activation in the context of mDC-T-cell coculture.**

(A) Generation of chimeric MOPV and LASV viruses. In the schematic views, the black segments correspond to MOPV elements and grey segments to LASV elements. LASV<sub>NP ExoN</sub> has mutations in the NP exonuclease domain that make it nonfunctional. MOPV<sub>IGRS LASV</sub> and LASV<sub>IGRS MOPV</sub> have exchanged intergenic regions of the S segment. The images show the plaque phenotypes of the viruses. (B-C) mDCs were infected with wild type (WT) or chimeric viruses (MOI = 1) or were uninfected and cultured with T cells for one or two days. (B) Fold change between 1 and 2 dpi in intracellular viral RNA levels ( $\log_2$ [(RNA copy per cell at 2 dpi)/(RNA copy per cell at 1 dpi])). (C) Quantification of IFN-I mRNA at 1 dpi is expressed as the gene/GAPDH ratio. Black and grey bars correspond to viruses with the MOPV and LASV backbones, respectively. Data shown are the means and SEM of four independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*).

**Fig 7. T cell responses to chimeric viruses correlate with mDC activation.**

mDCs were infected with WT or chimeric viruses (MOI = 1) or were uninfected and cultured with T cells for 1, 2, or 12 days (see indications on graphs). T cells were analyzed by flow cytometry. CD4 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells (A) and CD8 T cells as CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (B). Cells positive for activation molecules were counted. Results are expressed as the percentage of positive CD4 (A) or CD8 (B) T cells. Black and grey bars correspond to viruses with the MOPV and LASV backbones, respectively. Data shown are the means and SEM of four independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*).

**S1 Fig. mDC response to MOPV and LASV.**

(A) mDCs were infected with MOPV (MOI = 2) or were uninfected and cellular RNA collected every 8 hpi. Quantification of IFN-I and TNF $\alpha$  mRNA was normalized to GAPDH expression. Data plotted are the fold change in MOPV-infected mDCs relative to uninfected mDCs. (B-C) mDCs were cultured for 24 h with MOPV or LASV (MOI = 2). Viral genomes in culture medium (B) or cell pellet (C) were quantified by RT-qPCR. (D) mDCs were cultured for 24 h with culture medium (mock), MOPV, or LASV (MOI = 1). Cellular mRNAs from three independent experiments were quantified using poly-A amplification and next-generation sequencing. Data shown are the differential expression of genes from the "dendritic cell maturation" pathway (from Ingenuity Pathway Analysis). Genes shown in this figure had significant differences of expression (adjusted  $p < 0.05$ ).

**S2 Fig. MOPV and LASV infection of mDCs in coculture with T cells**

(A-B) mDCs were infected with MOPV or LASV (MOI = 1) and cultured with T cells. Culture medium (A) was collected at day 2, 5, 8 and 12 post-infection, and cells (B) were collected at day 1, 2, 5, 8, 12 and 15 post-infection. Viral genomes in culture medium (A) or cell pellets (B) were quantified by RT-qPCR. (C) mDCs were infected with Z-tagged MOPV or LASV (MOI = 1) or uninfected (mock), and cultured with or without T cells (mDC alone and mDC in coculture, respectively). 2, 5 or 8 dpi, mDCs positive for the Z protein were quantified by flow cytometry. A549 cells infected with Z-tagged MOPV or LASV (MOI = 0.1) for 1 or 2 days were used as a control.

**S3 Fig. MOPV and LASV infection of T cells**

For the "LT in coculture" condition, mDCs were infected with Z-tagged MOPV or LASV (MOI = 1) or uninfected (mock), and cultured with T cells. For the "LT" condition, purified T cells were infected with Z-tagged MOPV or

LASV (MOI = 0.1) or uninfected (mock). 1, 2, 5 or 8 dpi, CD4 (A) and CD8 (B) T cells positive for the Z protein were quantified by flow cytometry. A549 cells infected with Z-tagged MOPV or LASV (MOI = 0.1) for 1 or 2 days were used as a control.

**S4 Fig. Evolution of mDC-T cell coculture over time.**

(A) mDCs were infected with MOPV or LASV (MOI = 1) or were uninfected and cultured for 48 h with T cells. Quantification of IFN-I and CXCL10 mRNA is expressed as the gene/GAPDH ratio. (B-C) CD4 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells (B) and CD8 T cells as CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (C). Cells positive for activation molecules were counted. Results are expressed as the percentage of positive CD4 (B) or CD8 (C) T cells. Data shown are the means and SEM of seven independent experiments. Statistical significance was assessed by the non-parametric Wilcoxon test and differences were considered to be significant for  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

**S5 Fig. Verification of ORF exchanges between MOPV and LASV**

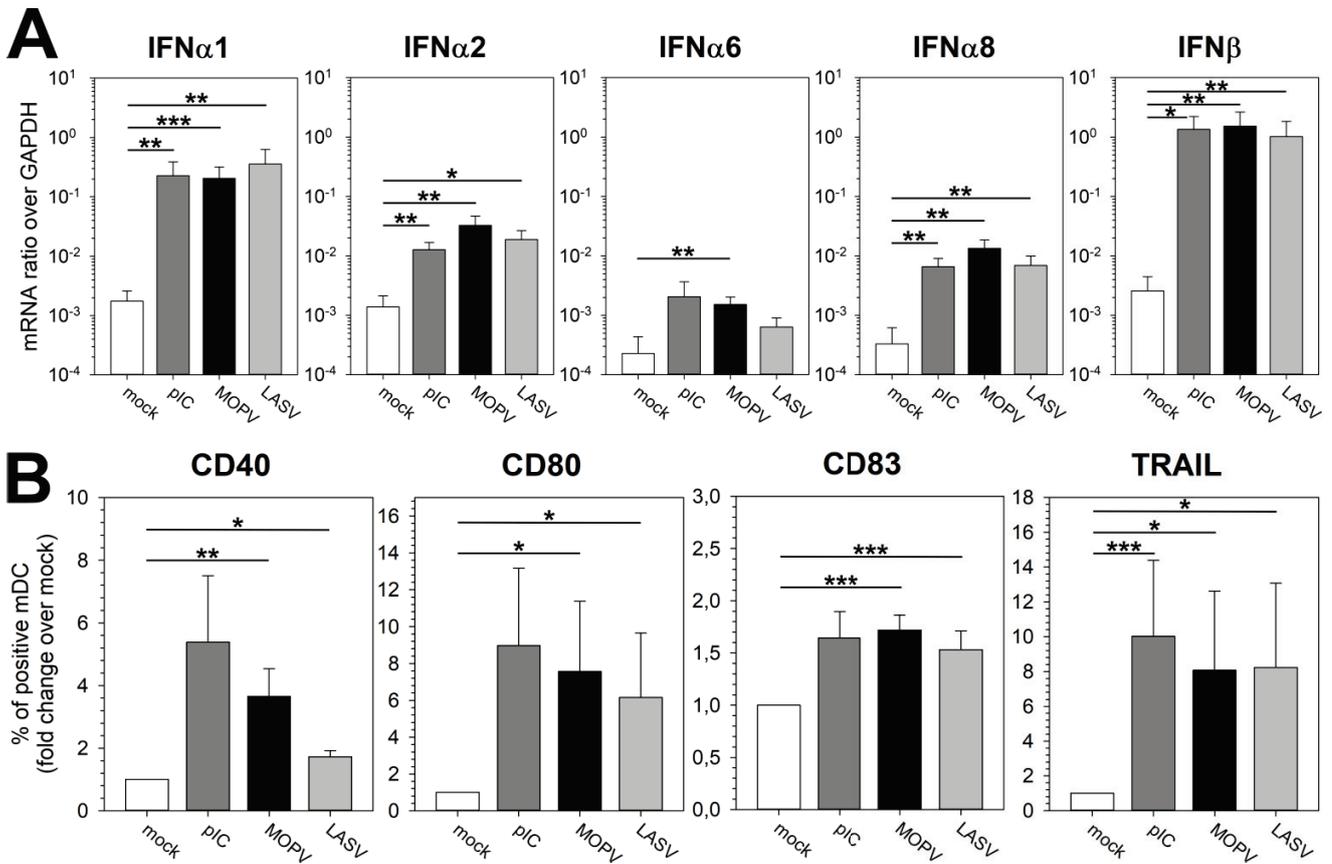
VeroE6 cells were infected with wild type and chimeric viruses (MOI = 0.01) for 4 days. Culture medium was collected and the natures of the viral stocks were determined by next generation sequencing. Data show the coverage of the obtained sequences, using MOPV (A) or LASV (B) genome as a reference.

**S6 Fig. Characterization of MOPV and LASV chimeras**

(A-B-C) VeroE6 cells were infected with wild type and chimeric viruses (MOI = 0.01) for 4 days. (A) Cells were lysed 4 dpi, and viral proteins were detected by western blot. The anti-GP antibody only recognizes LASV GP1. The anti-NP antibody better recognizes LASV NP compared to MOPV NP. The anti-Z antibody recognizes both LASV and MOPV Z. (B) Culture medium was collected from 0 to 4 dpi and viral titers were determined. Data shown represent the mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments. (C) Viral genomes in the culture medium were quantified by RT-qPCR 4 dpi. Data shown represent the mean  $\pm$  SE of the viral genomes/viral titer ratio for 4 independent experiments. Black and grey bars correspond to viruses with the MOPV and LASV backbones, respectively. (D) mDCs were infected with wild type and chimeric viruses (MOI = 1) and cultured with T cells. Culture medium was collected at day 2, 5, 8 and 12 post-infection, and viral titers were determined. Data shown represent the mean  $\pm$  SE of 3 independent experiments.

**S7 Fig. Gating of mDCs and T cells by flow cytometry.**

(A) Gates used to identify purified mDCs (Fig 1B). Data shown here are for uninfected mDCs at 24 hpi. Part of the debris was eliminated on FSC-SSC (cells). SSCint/SSCtof was used to exclude doublets (single). Among the "single" gated cells, mDCs were gated as Lin1<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup> cells. Lin1<sup>-</sup>/HLADR<sup>-</sup> contained mostly debris. Contaminating cells (Lin1<sup>+</sup>) represented less than 25% of the cells in all experiments and were mainly monocytes (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>), B cells (CD20<sup>+</sup>), and T cells (CD3<sup>+</sup>). (B) Gates used to identify mDCs in mDC-T coculture (Fig 4B). Data shown here are for uninfected cocultures at 48 hpi. Part of the debris was eliminated on FSC-SSC (cells). SSCint/SSCtof was used to exclude doublets (single). Among the "single" gated cells, mDCs were gated as Lin1<sup>-</sup>/HLADR<sup>+</sup> cells. (C) Gates used to identify CD4 and CD8 T cells in mDC-T coculture (Fig 4B). Data shown here are for uninfected cocultures at 48 hpi. Lymphocytes (Lympho) were selected based on phenotype using FSC-SSC. SSCint/SSCtof was used to exclude doublets (single). Among the "single" gated cells, CD4 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells (lower right panel). CD8 T cells were gated as CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> cells, and Natural Killer cells (NK) as CD3<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> cells (upper right panel).



**Fig 1. Primary human mDCs are activated by both MOPV and LASV.**

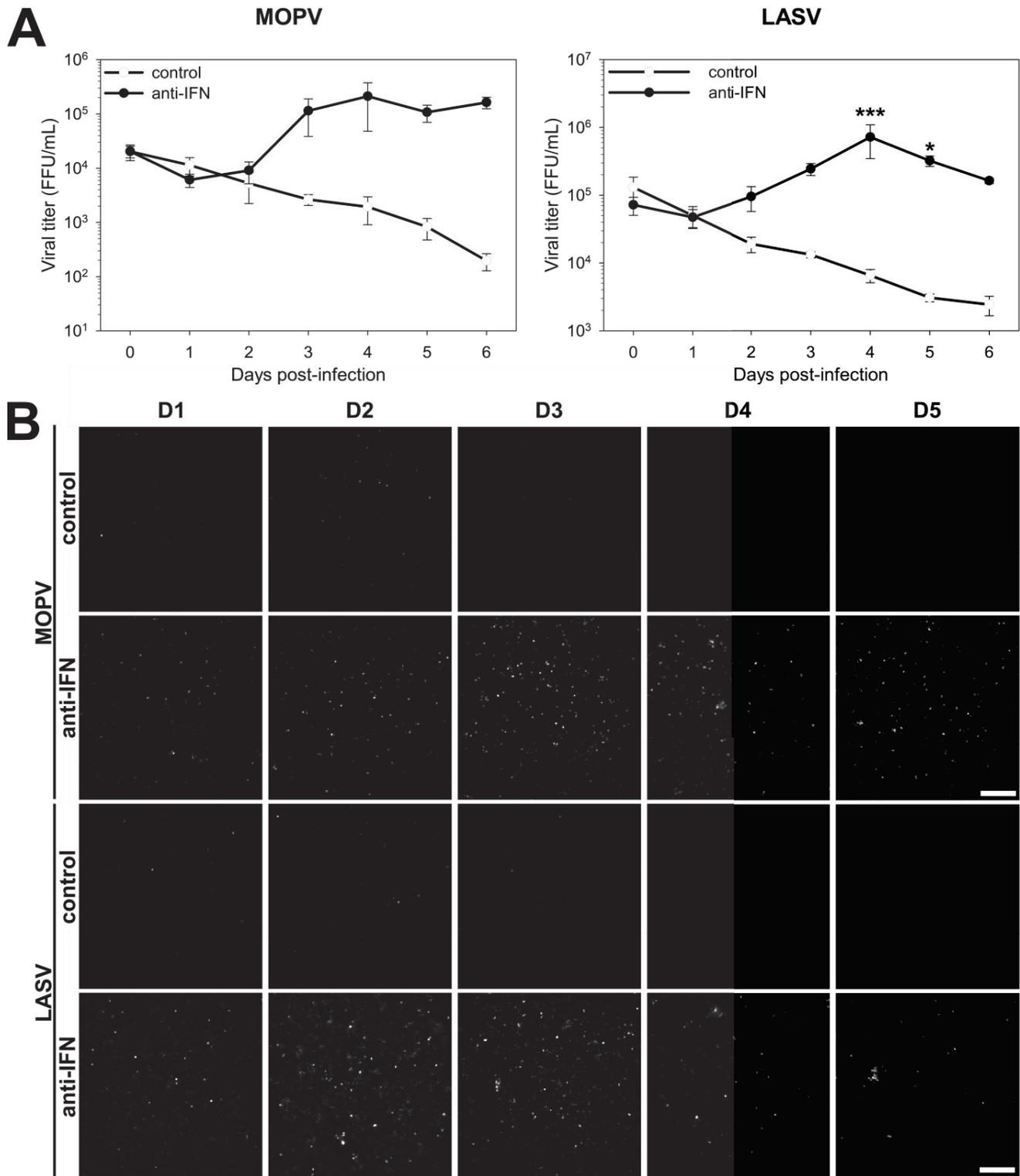


Fig 2. MOPV and LASV infection of mDCs is inhibited by the IFN-I response.

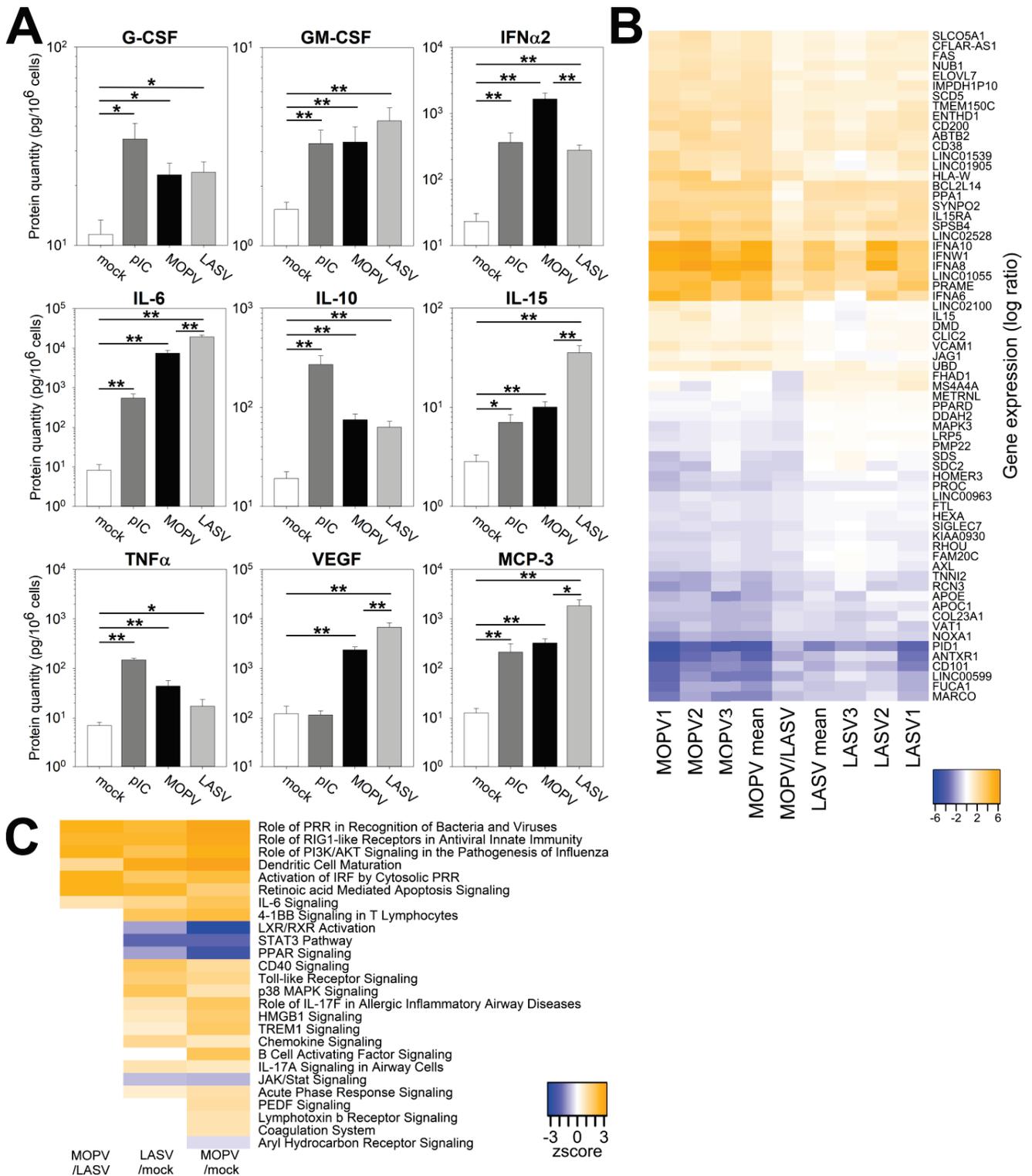


Fig 3. Activation patterns are different between MOPV- and LASV-infected mDCs.

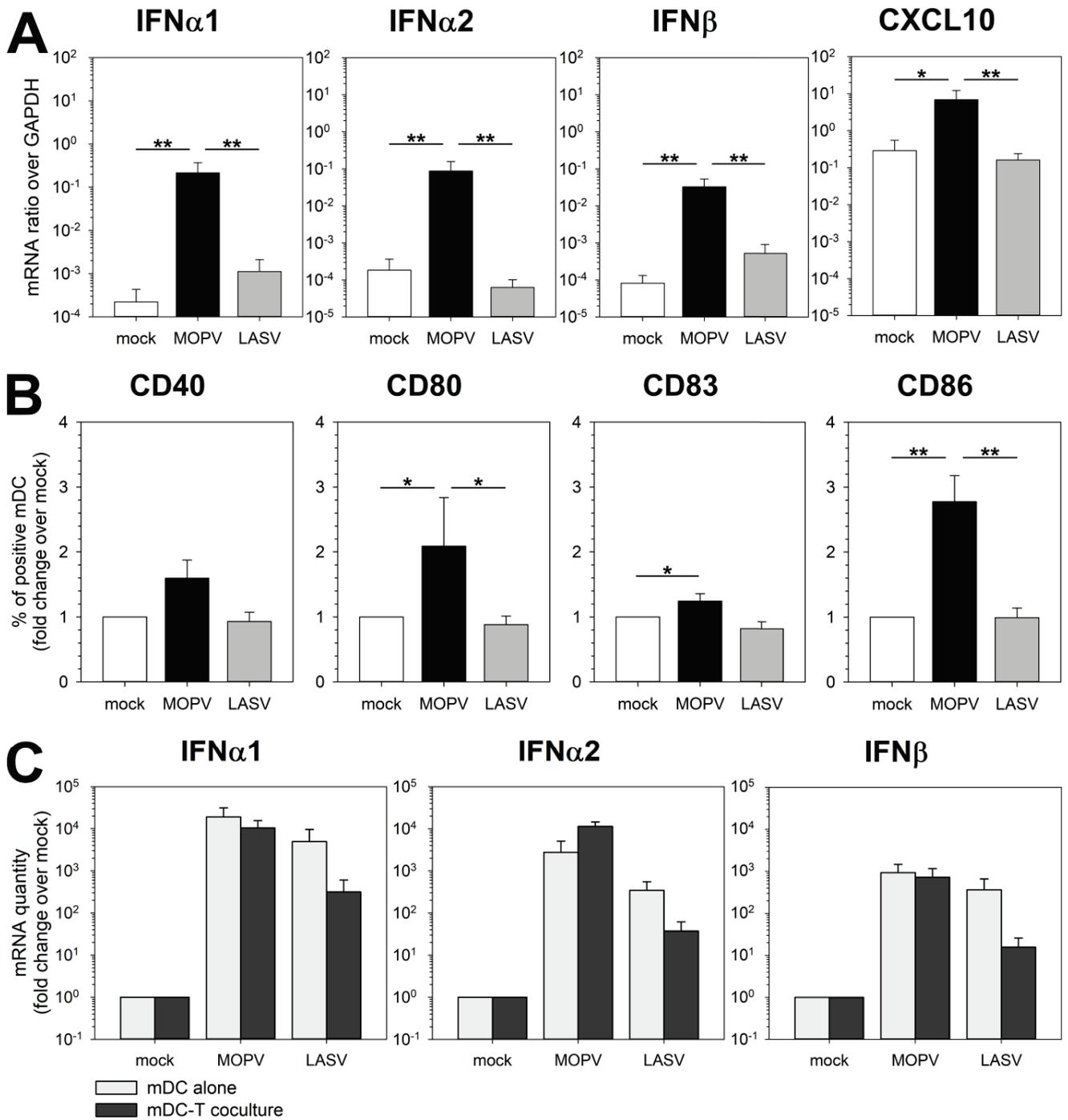


Fig 4. The mDC response to MOPV and LASV is modulated by coculture with T cells.

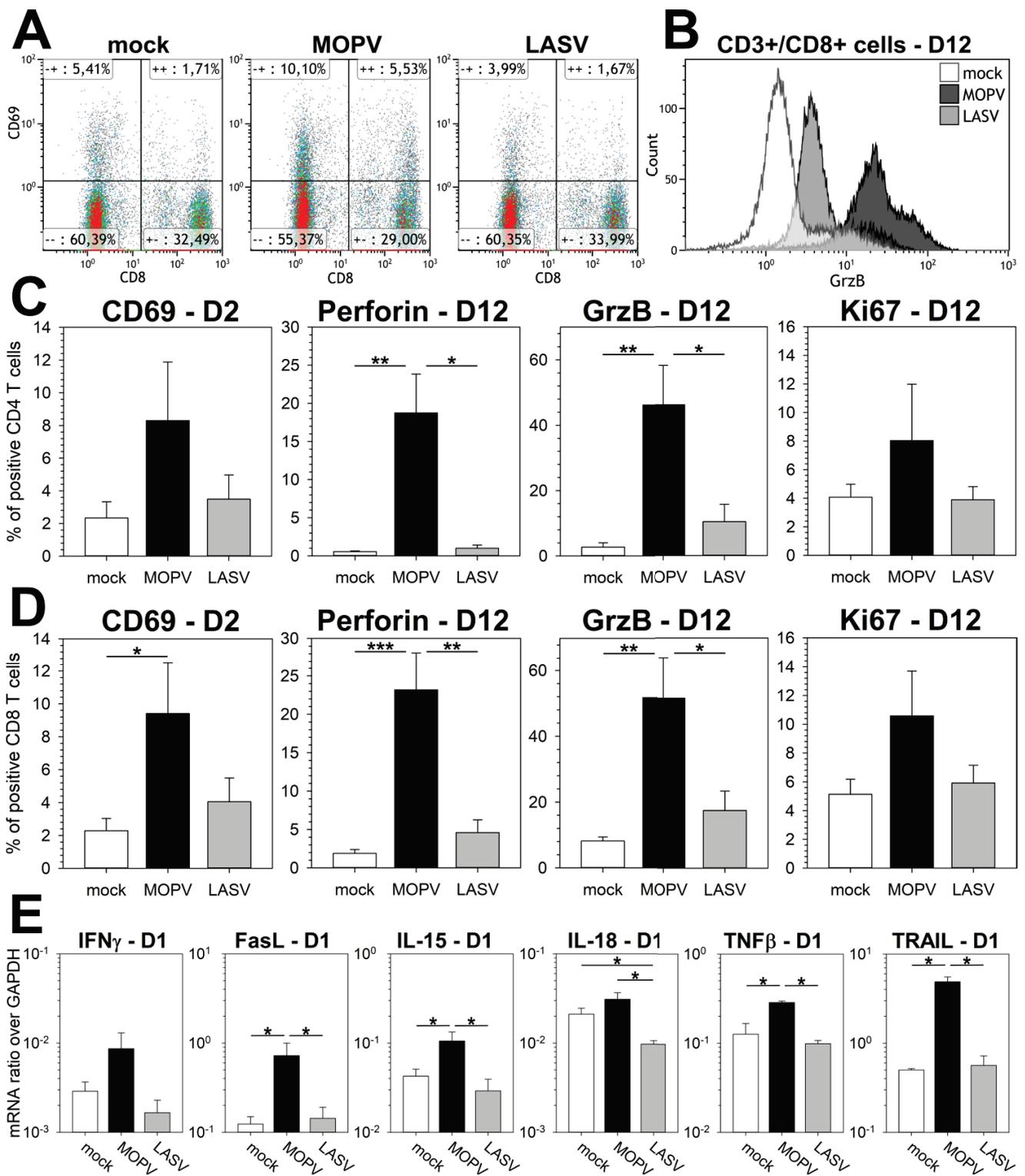
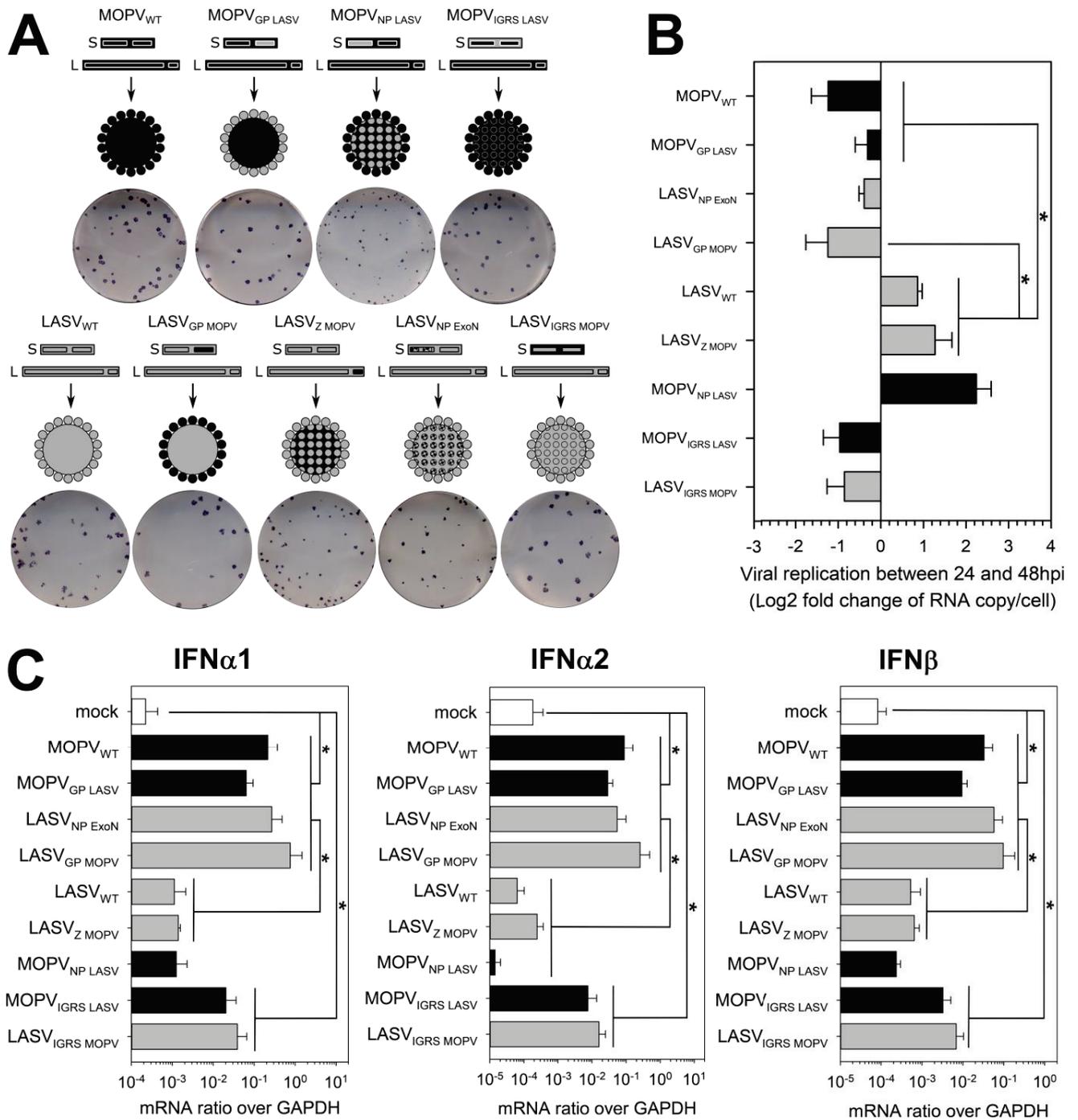
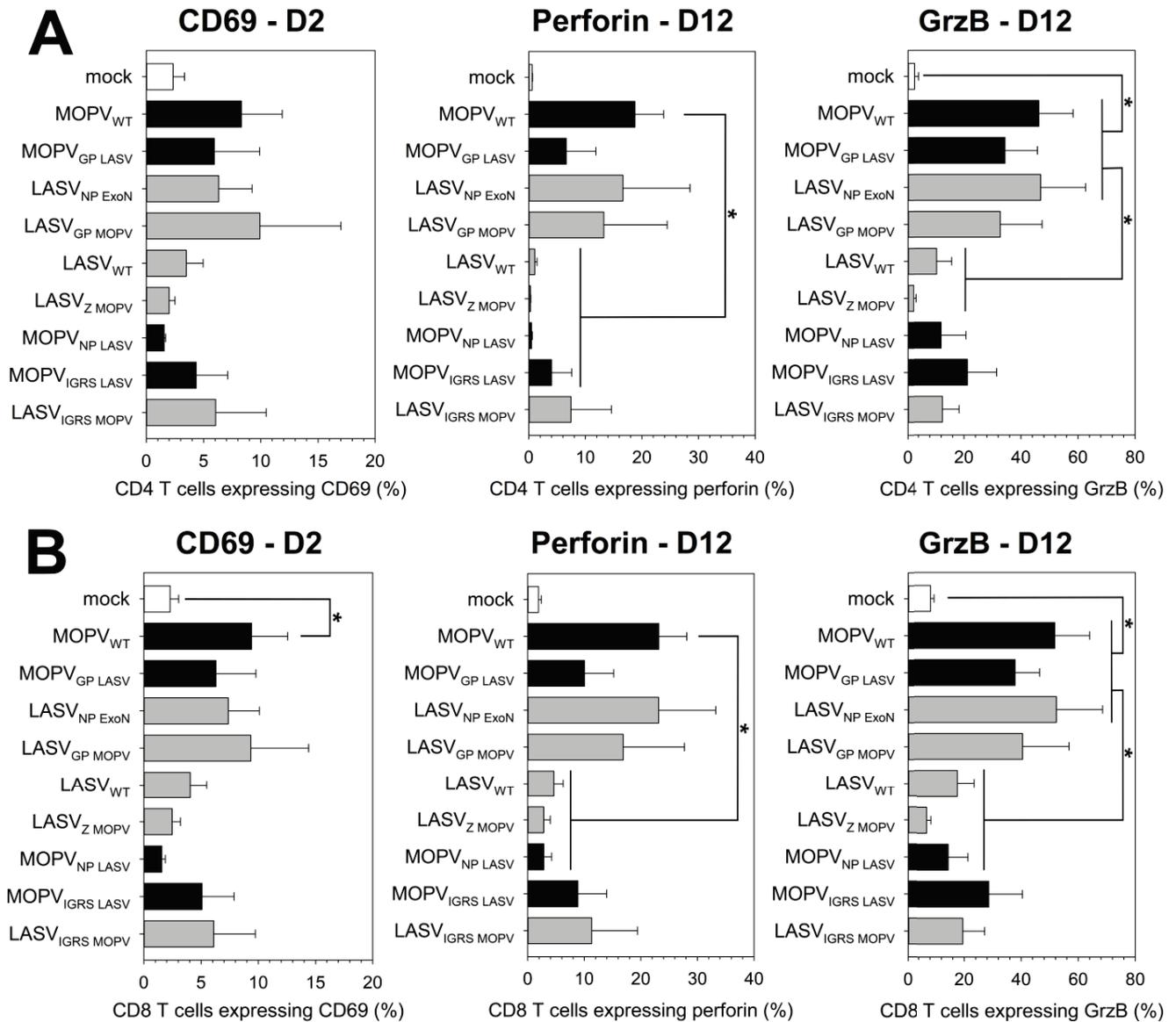


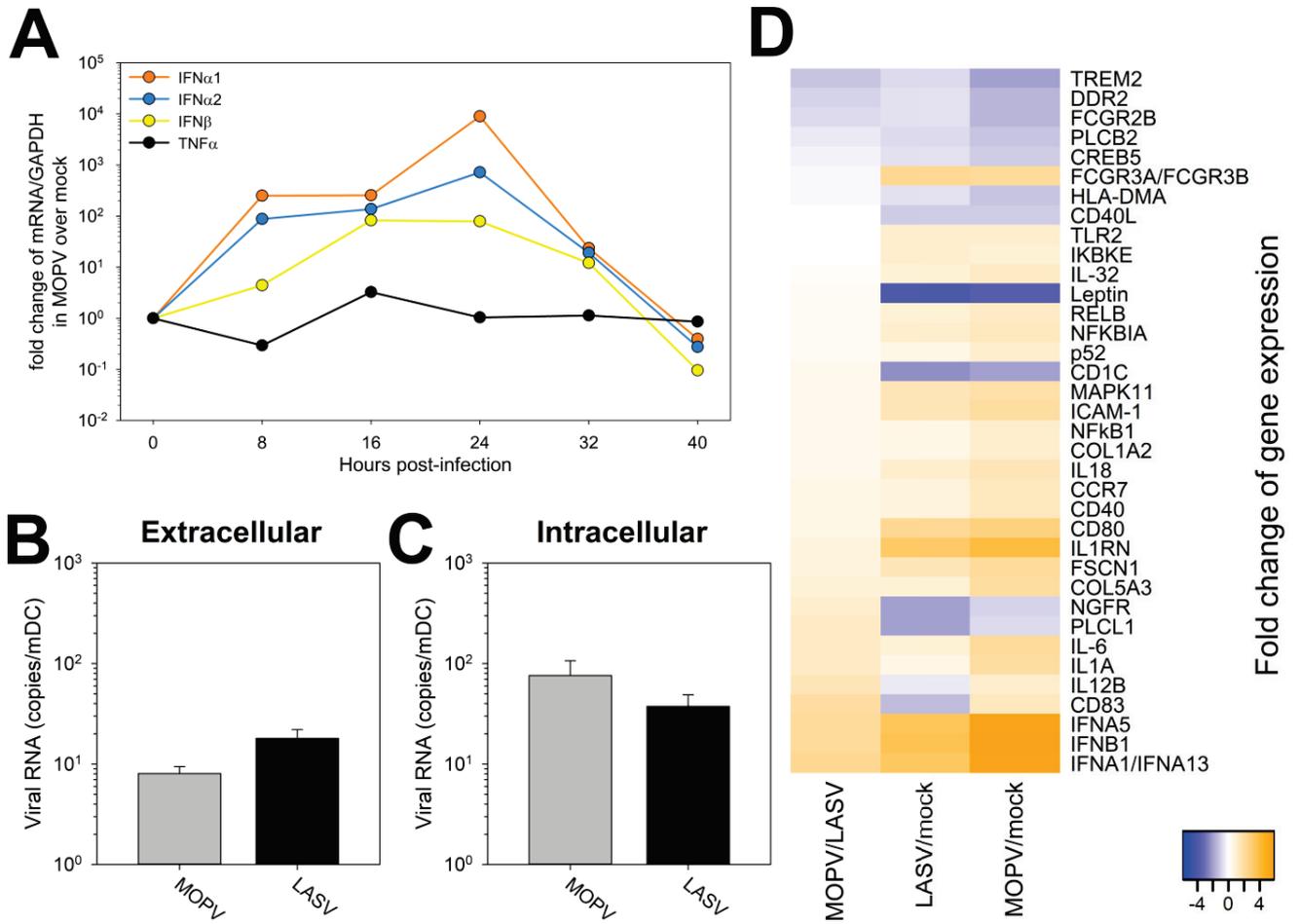
Fig 5. MOPV-infected mDCs, but not LASV-infected mDCs, induce T-cell activation and a cytotoxic response.



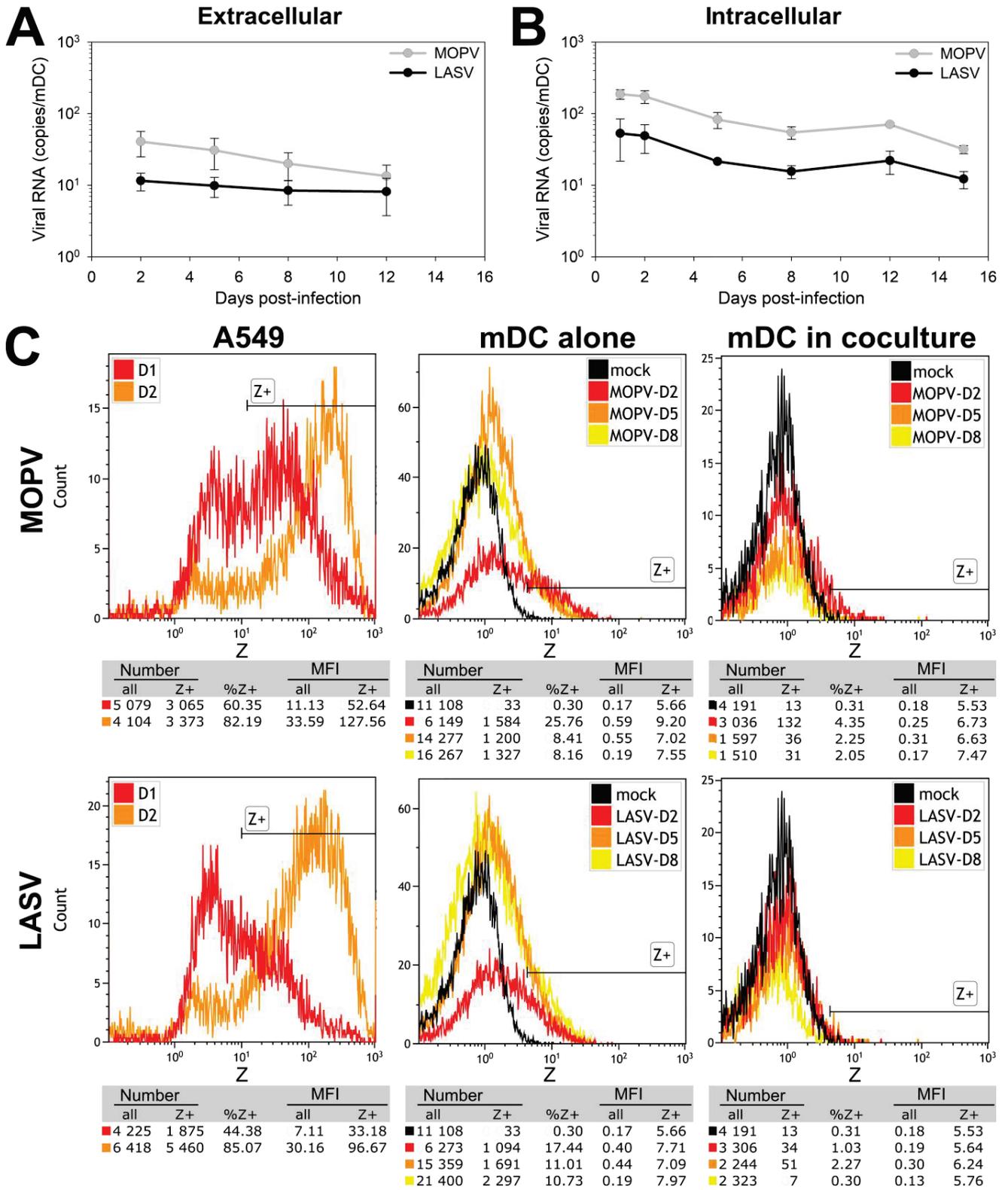
**Fig 6. Exchanging viral proteins between MOPV and LASV modifies mDC activation in the context of mDC-T-cell coculture.**



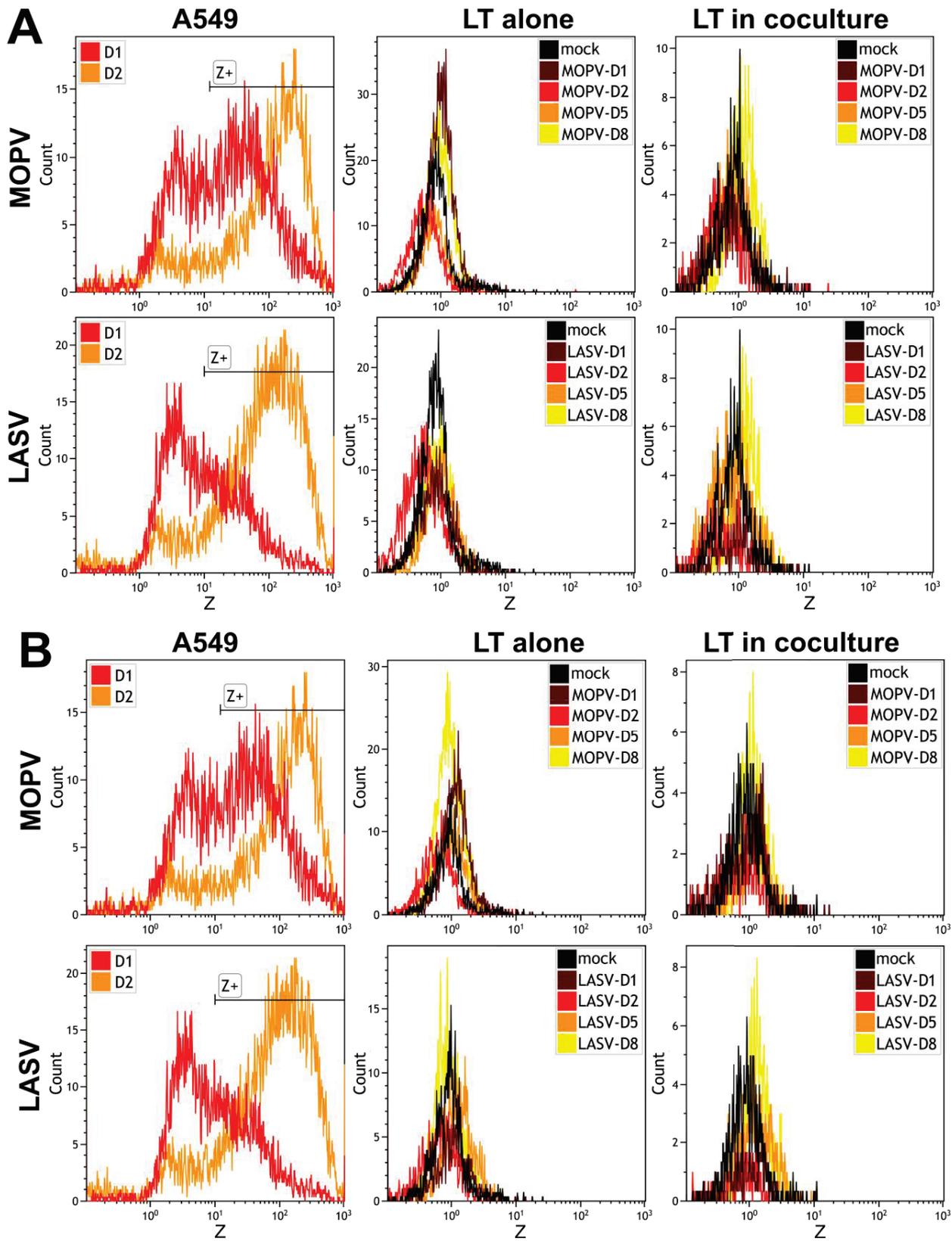
**Fig 7. T cell responses to chimeric viruses correlate with mDC activation.**



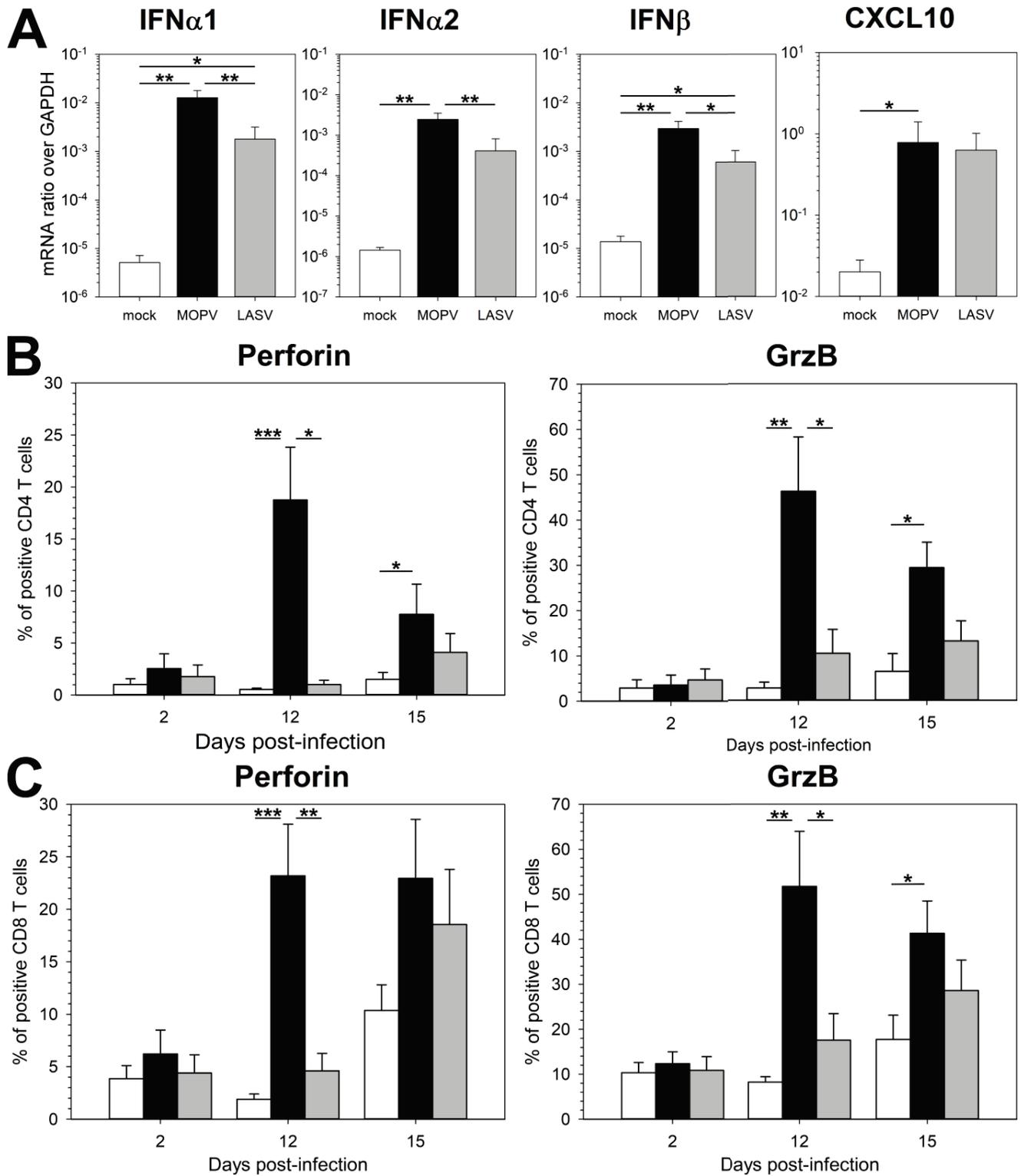
S1 Fig. mDC response to MOPV and LASV.



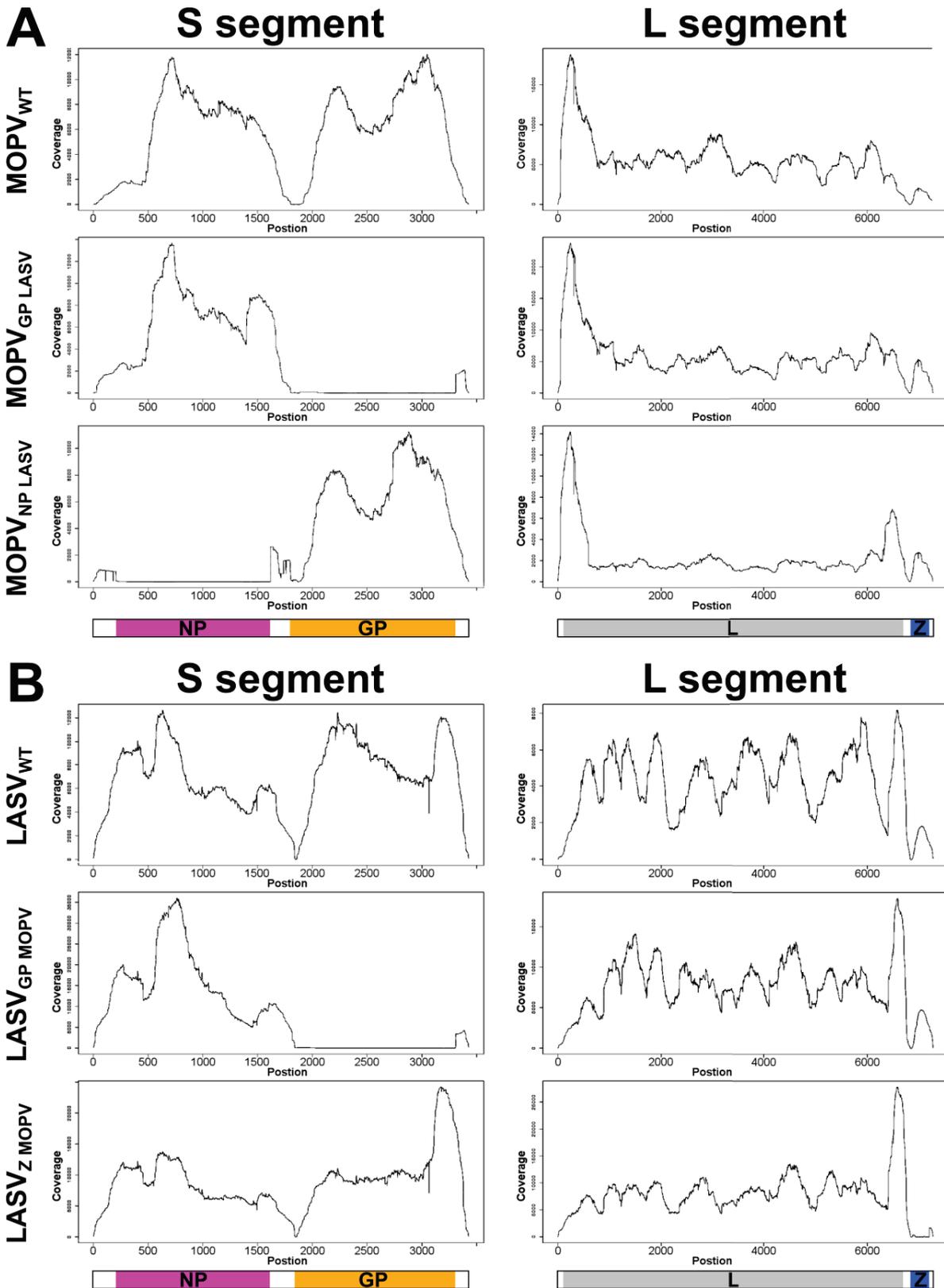
S2 Fig. MOPV and LASV infection of mDCs in coculture with T cells



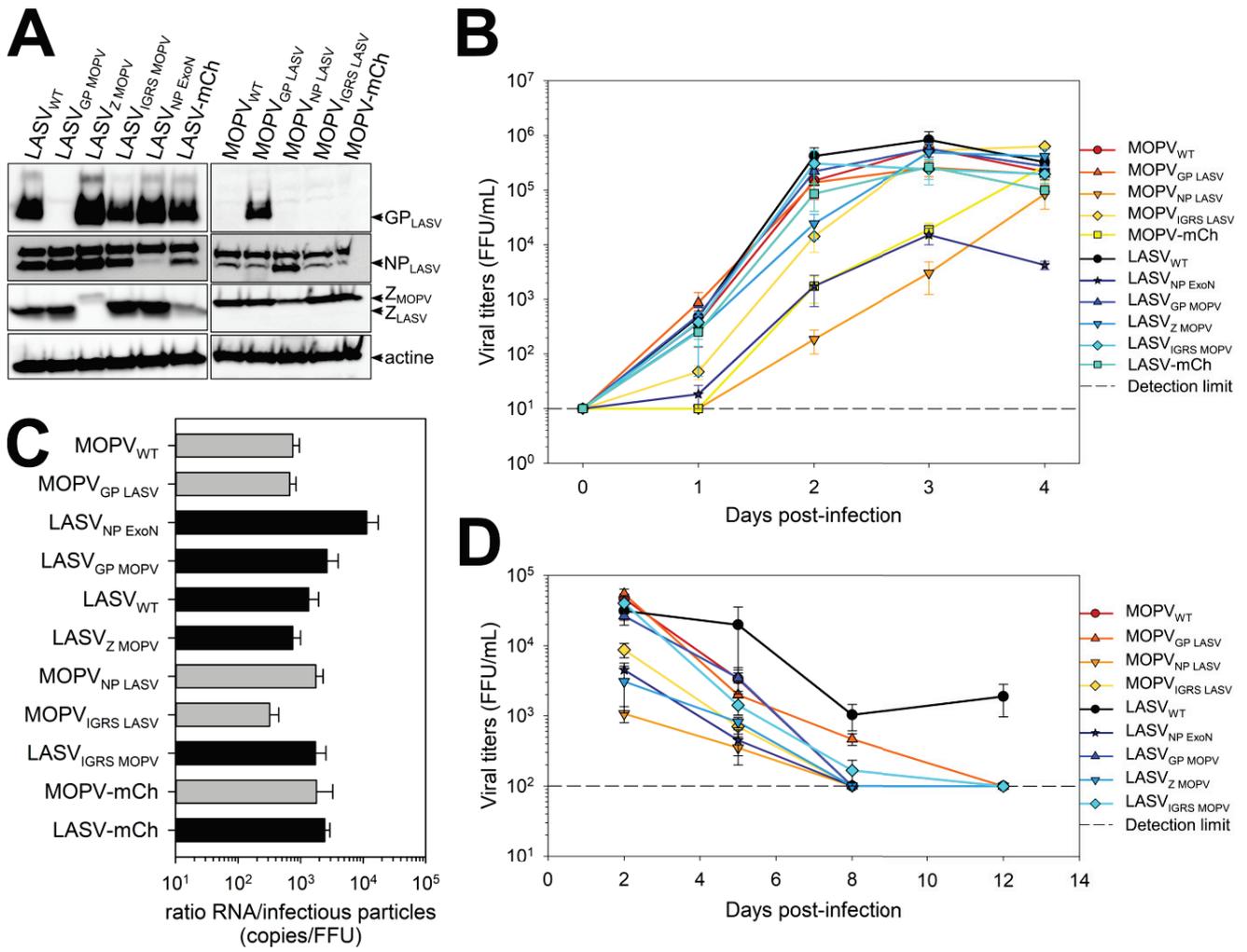
S3 Fig. MOPV and LASV infection of T cells



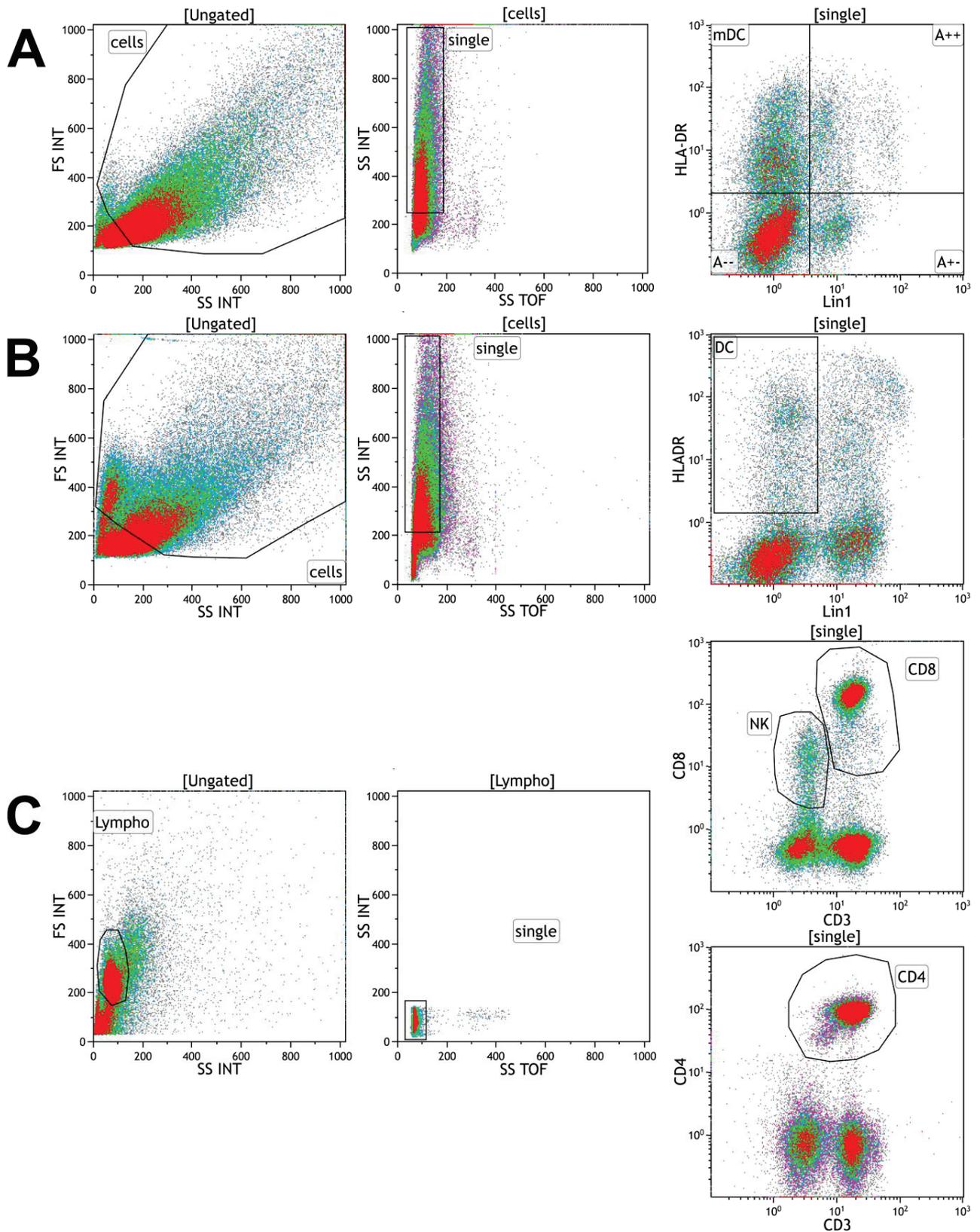
S4 Fig. Evolution of mDC-T cell coculture over time.



S5 Fig. Verification of ORF exchanges between MOPV and LASV



S6 Fig. Characterization of MOPV and LASV chimeras



S7 Fig. Gating of mDCs and T cells by flow cytometry.