



HAL
open science

Pathologie comparée de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus : mécanismes pathogéniques précoces, réponses immunitaires et marqueurs d'infection

Nicolas Baillet

► To cite this version:

Nicolas Baillet. Pathologie comparée de la fièvre de Lassa chez le singe cynomolgus : mécanismes pathogéniques précoces, réponses immunitaires et marqueurs d'infection. Virologie. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1307 . tel-03270772

HAL Id: tel-03270772

<https://theses.hal.science/tel-03270772>

Submitted on 25 Jun 2021

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 : 2018LYSE1307

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED340

Biologie moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Virologie

Discipline : Sciences de la vie

Soutenue publiquement le 19/12/2018, par :

Nicolas Baillet

**Pathologie comparée de la fièvre de Lassa chez le singe
cynomolgus – Mécanismes pathogéniques précoces, ré-
ponses immunitaires et marqueurs d'infection**

Devant le jury composé de :

Mathias Faure, Professeur, UCBL
Elisabeth Menu, Directrice de Recherche, CEA/Institut Pasteur
Pierre Roques, Chargé de Recherche, CEA
Renaud Mahieux, Professeur, ENS Lyon
Marion Russier, Chercheure, Max Planck Institute of Biochemistry

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examinatrice

Sylvain Baize, Directeur de Recherche, Institut Pasteur

Directeur de thèse

Remerciements

Nombreuses sont les personnes à qui je dois d'avoir pu mener à bien ce travail, que ce soit pour leur soutien, leur participation, leur contribution ou bien simplement leur présence au cours de ce projet. Cette partie de ma thèse dédiée aux remerciements est donc, pour ma part, toute aussi importante que le reste de son contenu.

Mes premiers remerciements s'adressent naturellement à mon directeur de thèse, Sylvain, sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Merci de m'avoir fait confiance pour mener un projet aussi original, vaste et stimulant. Tu auras permis la réalisation d'un souhait que j'avais depuis longtemps : travailler en laboratoire P4 sur des virus hautement pathogènes. Je te suis également reconnaissant pour m'avoir fait participer au diagnostic Ebola en Guinée, une expérience qui a été très riche sur de nombreux plans. Enfin, merci pour ton encadrement et ton recadrement à certains moments mais également de m'avoir laissé libre à d'autres.

Je tiens à remercier la Direction Générale de l'Armement et l'Institut Pasteur pour le financement du projet et de ma thèse. Je souhaite adresser des remerciements particuliers au Dr. Emmanuelle Guillot-Combe pour m'avoir permis d'obtenir une année de financement supplémentaire et de finir ainsi mes travaux. Merci également pour votre soutien et votre implication tout au long du projet ainsi que pour les invitations aux congrès et à la rédaction d'articles.

Je remercie mes rapporteurs, le Dr. Elisabeth Menu et le Dr. Pierre Roques, d'avoir accepté d'évaluer et de juger mes travaux de thèse, ainsi que pour leur réactivité dans l'organisation de la soutenance et leurs remarques pertinentes après la lecture de ce manuscrit. Je remercie également mes examinateurs, le Dr. Marion Russier, le Pr. Renaud Mahieux et le Pr. Mathias Faure pour avoir accepté d'examiner mes travaux.

Je souhaiterais remercier également les membres de mon comité de suivi de thèse, le Dr. Asier Saez-Cirion et le Pr. Mathias Faure pour avoir régulièrement suivi et jugé l'avancement de mes travaux.

Rien de tout cela n'aurait été possible sans l'aide des membres de l'UBIVE, passés et présents, à qui je tiens à adresser un énorme merci. A toi, Stéphanie, pour les heures in-cal-cu-lables passées dans le P4 au cours des manips animales, où on sait quand on entre, mais jamais quand on sort. Je n'oublierai pas ces nombreuses heures passées ensemble à faire du trafic de sang, triturer des organes, compter des cellules, espérer voir la fin des marquages de cytométrie (puis désespérer...), et pleins d'autres aventures qui comprennent aussi les weekends ! Je remercie ton expertise technique, ta rigueur et ton optimisme à toute épreuve sans lesquels je ne serai pas allé bien loin. Alors oui, pour toutes ces raisons et

comme tu le dis souvent, je te suis « reconnaissant à vie » ! Tu es une personne géniale et ça a été un plaisir de travailler avec toi ! Je remercie bien sûr Sylvain, Alexandra, Justine, Xavier, Mathieu, Caroline et Sophie pour votre mobilisation et vos encouragements lors de chaque manip animale, qui vous ont couté à vous aussi de longues heures dans le P4 mais qui m'ont été d'une aide précieuse. Un merci particulier à toi, Sophie, pour ton encadrement dès mon entrée dans l'unité, pour nos craquages pendant les manips, pour tes fou-rires et tes phrases si drôles qui portent souvent à double sens. Grand merci à toi Justine, pioupiou n°2 et fidèle acolyte de bureau, pour ton soutien et ton aide pendant 4 ans, et aussi d'avoir tenu tête à mes phases pessimistes. Je vais me sentir bien seul dans ce petit bureau quand tu seras parti et tes coups de règles après chaque remarque sexiste vont me manquer... Tu es une fille brillante et très à l'écoute des soucis des autres, ce qui m'a beaucoup aidé. Je te souhaite toute la réussite possible pour la suite mais te connaissant, je ne me fais pas trop de soucis là-dessus, je sais que tu iras loin ! A toi Béa, alias Maman bis, pour savoir gérer tous les problèmes administratifs aussi efficacement, pour toutes les histoires que tu as à raconter, pour ton soutien, pour ton dynamisme au labo et pour tout le reste ! Merci Xavier et Mathieu, pour votre expérience, vos nombreux conseils avisés, votre aide dans les manips, votre sens de l'humour ainsi que nos conversations scientifiques (ou non) au labo mais aussi pour tous les moments qu'on a passé en dehors du labo. Je me rends compte qu'au cours de ces 4 années, on a passé beaucoup de temps à discuter et plaisanter ensemble et cela a été très important pour moi. Merci Alexandra, pour toute l'aide que tu m'as apporté quand je ne pouvais pas assurer les manips seul et pour ton efficacité redoutable pendant les ELISA ainsi que ton dynamisme à tout moment de la journée. J'ai toujours apprécié ta personnalité, autoritaire parfois mais aussi très à l'écoute et prête à rendre service ! Merci Damien et Caroline pour votre gentillesse et pour nos discussions de couloirs (souvent non scientifiques !) entre deux manips ou celles pour passer le temps quand on a rien à faire ! Merci à Jimmy, avec qui on peut travailler facilement tout en racontant des choses que je n'oserais pas mentionner ici, et à Othmann pour tes remarques bibliographiques pertinentes et ton côté maladroit qui me fait bien rire... Vous êtes les thésards successeurs de l'équipe et je vous souhaite bon courage pour le reste de vos thèses, en espérant que les multiples viennoiseries, gâteaux, chocolats et bonbons n'aient pas raison de vous avant ! Merci également aux anciens membres que j'ai rencontrés à l'UBIVE : Marielle, pour ton aide dans les manips autophagie ; Nelly pour tous les moments qu'on a passés ensemble dans le bureau des pioupious (ou le bureau des plaintes) et Héloïse pour toutes nos conversations très cordiales et polies bien sûr !

Je tiens à remercier chaleureusement la direction du laboratoire P4, notamment le Dr. Hervé Raoul, ainsi que les membres de l'équipe P4 pour m'avoir permis d'effectuer la totalité des expérimentations animales pendant ma thèse, ce qui n'était pas évident dans le contexte de l'épidémie Ebola. Mille mercis à Laura pour ton implication au cours de toutes les expérimentations et pour avoir permis que celles-ci se réalisent, pour ta patience inébranlable avec la GDS et pour ta bonne humeur malgré la difficulté de ces manips. Un grand merci aux membres de l'animalerie, présents et anciens, Frédéric,

Stéphane B, Audrey, Aurélie, Marine, Cathy, Cindy et Julie pour votre superbe travail au cours des expérimentations, vos rendus de rapports et bien sûr pour les nombreuses heures passées en laboratoire, en semaine et les weekends. Merci à l'équipe biosécurité, en particulier Christophe et Béatrice, d'avoir été si patients et si prévenants pendant les manips animales et je m'excuse encore de vous avoir fait attendre jusque très tard le soir, en semaine et en weekend ! Merci également à l'équipe *in vitro*, Stéphanie, Steph, Damien, Delphine, Sabine, Elodie et Anne pour votre support, votre patience et pour votre gentillesse durant toutes ces heures de P4 ! Merci aussi à Alban pour ton sens de l'humour !

Par ailleurs, je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé en collaboration pendant ce projet. Merci à l'équipe Histopathologie Humaine et Modèles Animaux de l'Institut Pasteur, notamment Patrick Avé et Laurence Fiette pour votre accueil et votre formation en histologie. Merci beaucoup à Grégory Jouvion pour tes visites à Lyon et ton expertise en anatomopathologie. J'ai beaucoup apprécié ton dynamisme et ton optimisme à chacune de tes observations. Merci également à David Hardy pour le travail que vous avez effectué. Je remercie également Emeline Perthame, Rachel Legendre et Marie-Agnes Dillies de la plateforme Biostatistique et Bioinformatique de l'Institut Pasteur, pour leur travail dans l'analyse du transcriptome et les nombreux résultats qu'elles ont dû mettre en forme.

Enfin, je tiens à remercier mes amis, qui m'ont soutenu et sorti du monde de la Recherche. Je ne peux pas les nommer tous mais merci à vous.

A mes amis d'enfance, Manu, Christian et Corentin pour tous les moments vécus ensemble dans ce paisible village de Montmorin et qui me laissent des souvenirs plein la tête. Merci à mes amis du collège qui se reconnaîtront et avec qui j'adore partager mes weekends et mes vacances quand cela est possible.

A mes amis Lyonnais pour toutes ces soirées, ces weekends et aussi les séances tournages de grande production ! Merci à Nico D, Wil, Claire, Maryline, David, Stéph, Marie M, Marie C, Lucie et Marlène pour toutes les soirées houblonnées, synonymes de rigolade, bonne ambiance, mais aussi soutien et conseils en tout genre ! Merci à Nico D, mon homonyme et voisin de labo pour nos longues conversations (peu scientifiques !) passées dans mon bureau, euh non, ton bureau... enfin peu importe ! Je sais très bien que derrière ton côté provoc/réac à première vue se cache dans le fond quelqu'un plein de compassions et de bons conseils. Merci également à Stéphanie pour toutes les sorties et les découvertes Lyonnaises. Bref, merci à vous tous, et ceux que je n'aurais pas mentionné, pour ces moments de décompression qui ont été très importants pour moi. Ma vie Lyonnaise n'aurait pas été la même sans vous.

A mes colocos. Que ce soit à Villeurbanne ou à Lyon, que ce soit les premiers, ou les derniers, un grand merci à Christophe, Perrine, Anne Claire, Marie, et Alexis. Félicitations pour m'avoir subi toutes ces années, je n'oublierai pas toutes les anecdotes que j'ai vécues avec vous ! Merci en particulier à Christophe pour ta curiosité scientifique illimitée, ta gentillesse, tes conseils, et tous les moments qu'on a partagés, que ce soit à Lyon, ou un peu partout en France. J'espère que nous continuerons à tous nous voir, peu importe où la vie nous mènera.

A mes amis à l'international. Iliana et James, pour tous les moments extraordinaires qu'on a vécus, nos délires et tous ces endroits magnifiques de l'Ouest Américain que j'ai visités grâce à vous. A mon tour de vous rendre la pareille, je l'espère dans un futur proche.

Je voudrais également remercier mes parents, ma sœur, ma famille. C'est grâce à vous et à votre soutien si je suis arrivé là où je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir laissé la liberté d'entreprendre mon orientation et de m'avoir fait confiance à chaque étape. Merci d'avoir rendu tout cela possible.

Enfin, je voudrais remercier en particulier une personne à qui je dois beaucoup et qui a été la plus présente pendant ma fin de thèse. Merci Lucile pour tout ce que tu m'as apporté, d'un point de vue personnel mais également pour ton soutien sans failles dans les moments difficiles, ta patience, ta gentillesse et ton optimisme impressionnant. Merci de m'avoir supporté, une tâche que peu de personnes auraient réussie. Merci pour toutes tes attentions et tes encouragements qui m'ont aidé à aller de l'avant. Merci de m'avoir fait prendre du recul, faire des pauses et tout simplement penser à autre chose. Cette étape de ma thèse aurait été bien plus difficile sans toi à mes côtés. Je suis heureux de ce que nous vivons ensemble, des projets qui sont à venir et ceux qui, je l'espère, naitront derrière.

Je remercie au passage les personnes que j'aurais oublié de remercier.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	7
Liste des illustrations	12
Glossaire	15
Liste des abréviations	18
Résumé	20
Abstract	21
Introduction : Etat de l'art	22
I. Les fièvres hémorragiques virales.....	22
I.1. Définition.....	22
I.2. Fièvres hémorragiques dues aux Arenaviridae	23
I.3. Fièvres hémorragiques dues aux Bunyaviridae.....	23
I.4. Fièvres hémorragiques dues aux Flaviviridae.....	24
I.5. Fièvres hémorragiques dues aux Filoviridae.....	25
I.6. Impact des fièvres hémorragiques virales	25
II. Epidémiologie de la fièvre de Lassa	28
II.1. Aperçu sur les Arénavirus.....	28
II.1.a. Généralités.....	28
II.1.b. Phylogénie et évolution.....	30
II.1.c. Fièvres hémorragiques à Arénavirus.....	31
II.2. Epidémiologie de la fièvre de Lassa	32
II.2.a. La fièvre de Lassa dans les pays endémiques et limitrophes.....	32
II.2.b. Les cas d'importation de FL	35
II.3. Réservoir hôte et transmission	37
II.3.a. Chez le réservoir	37
II.3.b. Chez l'Homme.....	38
II.3.c. Distribution du LASV et de son réservoir	40
III. Structure et réplication du virus Lassa.....	42
III.1. Phylogénie et variabilité du virus Lassa.....	42
III.2. Structure du virus Lassa.....	43

III.2.a.	Structure du virion	43
III.2.b.	Organisation du génome	44
III.3.	Rôle des protéines virales	45
III.3.a.	La nucléoprotéine NP	45
III.3.b.	La polymérase L.....	47
III.3.c.	Les glycoprotéines GP1 et GP2	49
III.3.d.	La protéine de matrice Z.....	50
III.4.	Cycle viral.....	53
III.4.a.	Récepteur et entrée virale	53
III.4.b.	Réplication et transcription.....	55
III.4.c.	Assemblage.....	56
III.4.d.	Bourgeonnement et libération virale.....	58
IV.	Physiopathogenèse et réponses immunitaires associées à la fièvre de Lassa	60
IV.1.	Pathologie de la fièvre de Lassa.....	60
IV.1.a.	Généralités.....	60
IV.1.b.	Signes cliniques et issues de la FL chez l'Homme	60
IV.1.c.	Facteurs pronostics.....	62
IV.1.d.	Changements histopathologiques chez l'Homme	64
IV.2.	Modèles animaux de la fièvre de Lassa	68
IV.2.a.	Souris	68
IV.2.b.	Cobaye	69
IV.2.c.	Primates non humains.....	71
IV.2.d.	Modèles alternatifs.....	74
IV.3.	Physiopathogenèse.....	77
IV.3.a.	Etapes de la pathogenèse.....	77
IV.3.b.	Modèle de la pathogenèse.....	81
IV.3.c.	Persistance du virus	82
IV.4.	Les réponses immunitaires au cours de la FL	83
IV.4.a.	La réponse immunitaire innée.....	84
IV.4.b.	La réponse immunitaire adaptative.....	90
V.	Détection, prévention et traitement de la Fièvre de Lassa	95
V.1.	Diagnostic	95
V.1.a.	Détection du génome viral	95
V.1.b.	Détection des antigènes et anticorps.....	95
V.1.c.	Isolement du virus	96
V.2.	Traitements	96
V.2.a.	Ribavirine.....	97
V.2.b.	Anticorps neutralisants	97
V.2.c.	Composés expérimentaux.....	98

V.3.	Prophylaxie	98
V.3.a.	Prévention	98
V.3.b.	Essais vaccinaux	99
	Problématique & Objectifs.....	104
	Résultats.....	108
I.	Présentation du modèle expérimental de FL chez le singe cynomolgus et observations cliniques.....	108
II.	Altérations cliniques et hématologiques au cours de la FL.....	113
III.	Dynamique de la réplication virale au cours de la FL	118
III.1.	Virémie dans le sang et la moelle osseuse	118
III.2.	Charge virale dans les organes aux temps précoces.....	121
III.3.	Charge virale dans les organes pendant la phase d'incubation	122
III.4.	Charge virale dans les organes au pic de la maladie	124
III.5.	Charge virale dans les organes pendant la convalescence	126
III.6.	Cibles cellulaires du LASV au pic de la maladie.....	127
IV.	Modifications anatomopathologiques au cours de la FL	132
IV.1.	Modifications anatomopathologiques pendant la phase d'incubation.....	132
IV.2.	Modifications anatomopathologiques au pic de la maladie	134
IV.3.	Modifications anatomopathologiques pendant la convalescence.....	137
V.	Analyse comparative de la réponse immunitaire	138
V.1.	Réponses immunitaires dans le sang.....	138
V.1.a.	La réponse immunitaire innée et l'inflammation	138
V.1.b.	La réponse immunitaire adaptative T-CD4+ et T-CD8+	140
V.1.c.	La réponse mémoire des T-CD4+ et T-CD8+	146
V.1.d.	La réponse cellulaire B et la sécrétion d'anticorps	148
V.2.	Réponses immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires	150
V.2.a.	Prolifération des lymphocytes T.....	150
V.2.b.	Activation des lymphocytes T	151
V.2.a.	Cytotoxicité des lymphocytes T	152
V.2.b.	Inhibition de la fonction des lymphocytes T	155
V.2.c.	Apoptose des lymphocytes T.....	156
V.2.d.	Activation et maturation des lymphocytes B	157
V.3.	Etude du profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL	158
	Discussion.....	169
I.	Notre modèle de FL chez le singe cynomolgus	171

II.	Les données cliniques	174
III.	Le dynamisme viral et la physiopathogénèse	180
IV.	Le système immunitaire	187
IV.1.	La réponse immunitaire innée	187
IV.2.	La réponse immunitaire adaptative	189
IV.3.	La réponse humorale	193
V.	Analyses transcriptomiques	196
Conclusions & Perspectives		200
Matériel & Méthodes.....		206
I.	Expérimentations animales	206
I.1.a.	Cellules et Virus	206
I.1.b.	Animaux	207
I.1.c.	Infections	207
II.	Suivi des animaux : analyses cliniques, hématologiques, biologiques et prélèvements biologiques.....	207
II.1.a.	Autopsie des animaux et prélèvements des organes	208
II.1.b.	Suivi des animaux - prélèvements de sang total	209
II.1.c.	Suivi des animaux - prélèvement de la moelle osseuse	210
III.	Analyse de la virémie.....	211
III.1.a.	Analyse de la quantité de génome par RT-qPCR	211
III.1.b.	Analyse de la quantité de particules infectieuses par titrage	211
IV.	Analyse des réponses immunitaires	212
IV.1.a.	Technologie Luminex	212
IV.1.b.	ELISA pour IFN α	212
IV.1.c.	ELISA pour IgM/IgG	212
IV.1.d.	Cytométrie en flux	213
V.	Histologie	217
VI.	Transcriptomique	218
VII.	Analyses statistiques	219
Références.....		220
Annexes.....		233

Liste des illustrations

Figure 1 : Distribution géographique des fièvres hémorragiques virales (FHV).....	27
Figure 2 : Analyse phylogénétique des Arénavirus.....	31
Figure 3 : Distribution géographique des FHV à Arénavirus.....	32
Figure 4 : Distribution du virus Lassa en Afrique de l’Ouest.....	34
Figure 5 : Transmission du LASV chez le réservoir et du réservoir à l’Homme.....	39
Figure 6 : Phylogéographie de <i>Mastomys natalensis</i>	40
Figure 7 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes souches de LASV.....	42
Figure 8 : Morphologie du LASV.....	43
Figure 9 : Organisation du virion et du génome des Arénavirus.....	45
Figure 10 : Un modèle d’organisation de la NP et du complexe RNP des Arénavirus.....	46
Figure 11 : Structure de la polymérase L du LASV.....	48
Figure 12 : Représentation schématique de la GPC et des sous-unités GP1, GP2 et SSP.....	50
Figure 13 : Domaines structuraux et fonctionnels de la Z de LASV.....	51
Figure 14 : L’entrée du LASV.....	53
Figure 15 : Réplication du segment S du virus Lassa.....	55
Figure 16 : Interaction de la Z avec les autres protéines virales – rôle dans l’assemblage viral.....	57
Figure 17 : Bourgeonnement du LASV.....	58
Figure 18 : Représentation schématique du cycle viral du LASV.....	59
Figure 19 : Signes cliniques et issues de la FL.....	64
Figure 20 : Nécrose hépatique.....	65
Figure 21 : Changements anatomopathologiques systémiques dus au LASV.....	67
Figure 22 : Les principales espèces de PNH utilisés comme modèle pour la FL.....	71
Figure 23 : Modèle de la pathogenèse du virus Lassa.....	81
Figure 24 : Réponse immunitaire innée et contournement par le LASV.....	89
Figure 25 : Réponses immunitaires et issue de la maladie au cours de la FL.....	94
Figure 26 : Déroulement des expérimentations sur primates.....	108
Figure 27 : Signes cliniques et résultats expérimentaux.....	112

Figure 28 : Altérations biochimiques au cours de la FL.....	115
Figure 29 : Altérations des paramètres de coagulation au cours de la FL.....	116
Figure 30 : Etude de la virémie dans le sang au cours de la FL.....	119
Figure 31 : Etude de la virémie dans la moelle osseuse au cours de la FL.....	120
Figure 32 : Etude de la charge virale dans les organes à J2 post infection.....	122
Figure 33 : Etude de la charge virale dans les organes à J5 post infection.....	123
Figure 34 : Etude de la charge virale dans les organes à J11 post infection.....	125
Figure 35 : Etude de la charge virale dans les organes 28 jours post infection chez les animaux survivants.....	126
Figure 36 : Cibles cellulaires du LASV dans les organes des animaux morts de la maladie.....	129
Figure 37 : LASV infecte les macrophages mais pas les lymphocytes.....	131
Figure 38 : Changements anatomopathologiques dans les organes à J5 post infection.....	133
Figure 39 : Changements anatomopathologiques dans les organes lymphoïdes à J11 post infection.....	135
Figure 40 : Changements anatomopathologiques dans les organes à J11 post infection.....	136
Figure 41 : Changements anatomopathologiques dans les organes chez les survivants à J28 post infection.....	137
Figure 42 : Etude des populations immunitaires impliquées dans la réponse immunitaire innée.....	139
Figure 43 : Activation des monocytes et des cellules dendritiques au cours de la FL.....	139
Figure 44 : Cinétique de sécrétion des cytokines et chimiokines sécrétées par les CPA au cours de l'infection....	141
Figure 45 : Analyse de la réponse immunitaire T-CD4+ dans le sang au cours des différentes formes de FL.....	142
Figure 46 : Analyse de la réponse immunitaire T-CD8+ dans le sang au cours des différentes formes de FL.....	144
Figure 47 : Profil de sécrétion des cytokines lymphocytaires au cours de l'infection.....	146
Figure 48 : Caractérisation des populations lymphocytaires mémoires au cours de l'infection.....	148
Figure 49 : Caractérisation de la réponse cellulaire B et de la réponse humorale.....	149
Figure 50 : Prolifération des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL...	151
Figure 51 : Activation des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL.....	153
Figure 52 : Cytotoxicité des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL....	154
Figure 53 : Inhibition des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL.....	155
Figure 54 : Apoptose des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL.....	156
Figure 55 : Activation et maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes au cours de la FL.....	157
Figure 56 : Profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL (données individuelles).....	159
Figure 57 : Profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL (données regroupées).....	162

Figure 58 : Profil transcriptomique des PBMC J2 post infection.....	164
Figure 59 : Profil transcriptomique des PBMC J4 post infection.....	165
Figure 60 : Profil transcriptomique des PBMC J10 post infection.....	166
Figure 61 : Régulation des voies de signalisations au cours de la FL.....	167
Figure 62 : Comparaison des données cliniques en fonction de l'issue de la maladie.....	179
Figure 63 : Comparaison du tropisme viral et de la physiopathogenèse en fonction de l'issue de la maladie.....	186
Figure 64 : Comparaison des réponses immunitaires en fonction de l'issue de la maladie.....	195
Figure 65 : Comparaison du profil transcriptomique des PBMC en fonction de l'issue de la maladie.....	199
Figure 66 : Hypothèses sur la physiopathogenèse de la FL en fonction de l'issue de la maladie.....	202
Tableau 1 : Récapitulatif des virus responsables de FHV.....	26
Tableau 2 : La famille des <i>Arenaviridae</i>	29
Tableau 3 : Cas de FL exportées en dehors des zones endémiques.....	36
Tableau 4 : Modèles animaux de la fièvre de Lassa.....	76
Tableau 5 : Récapitulatif des principales plateformes vaccinales contre le LASV.....	103
Tableau 6 : Récapitulatif des cohortes utilisées au cours de l'étude.....	111

Glossaire

- Anasarque : Œdème généralisé du tissu cellulaire sous-cutané avec épanchement dans les cavités séreuses (plèvre, péricarde, péritoine). L'apparition d'une anasarque est due à diverses maladies (insuffisance cardiaque, cirrhose du foie ou insuffisance rénale) et entraîne une prise de poids importante, une fatigue intense et un essoufflement.
- Arthralgie : Douleur des articulations sans modification de l'apparence extérieure de la jointure, et intensifiée par la mobilisation des articulations atteintes. Les arthralgies sont fréquentes et d'intensité très variable. Elles peuvent être le symptôme d'une maladie articulaire (arthrite rhumatoïdale, arthrose), ou, si les examens biologiques et radiologiques sont normaux, ne pas avoir de cause physiologique identifiable.
- Asthénie : État de faiblesse générale caractérisé par une diminution du pouvoir fonctionnel de l'organisme, non consécutive au travail ou à l'effort et ne disparaissant pas avec le repos. L'asthénie diffère de la fatigue, phénomène naturel, et de l'adynamie, phénomène neuromusculaire. Plutôt que d'asthénie en général, il convient de parler d'états asthéniques, chacun ayant sa cause (somatique, psychique ou réactionnelle).
- Asymptomatique : Qui ne se manifeste pas par des symptômes ou signes cliniques (observés ou confirmés lors de l'examen direct du malade). C'est le cas de certaines maladies (hypertension artérielle, diabète).
- Choc hypotensif : Qui se rapporte ou est provoqué par l'hypotension.
- Choc hypoxique : Diminution de la concentration d'oxygène dans le sang.
- Choc hypovolémique : Diminution du volume sanguin efficace, c'est-à-dire de celui qui est physiologiquement nécessaire au maintien d'une fonction circulatoire normale. On distingue deux types d'hypovolémie. L'hypovolémie vraie est due à des pertes hémorragiques (hémorragie aiguë, extériorisée ou non) ou à une déshydratation (pertes plasmatiques ou hydroélectrolytiques provoquées par des brûlures étendues, une diarrhée, des vomissements, etc.). Dans l'hypovolémie relative, la diminution du retour veineux est due à un abaissement du tonus vasculaire (entraînant une dilatation des vaisseaux) et à une augmentation de la capacité veineuse (volume de sang que le secteur veineux est capable de contenir), provoqués par un état infectieux sévère, l'emploi d'anesthésiques, la prise de médicaments vasodilatateurs ou une intoxication par des médicaments psychotropes.
- Dysfibrinogénémie : Anomalie congénitale ou acquise de la coagulation, causée par la production d'un fibrinogène anormal. La dysfibrinogénémie congénitale ne provoque généralement pas de saignements majeurs, mais peut se traduire par une tendance hémorragique avec cicatrisation lente, par des avortements spontanés et, plus rarement, par des thromboses. La dysfibrinogénémie acquise se rencontre dans les cancers primitifs du foie et dans l'insuffisance hépatique avancée (hépatite et cirrhose). Elle n'entraîne pas de symptômes, mais l'anomalie témoigne de la gravité de l'atteinte hépatique.
- Endémie : Présence habituelle d'une maladie au sein d'une population ou dans une région. Une maladie infectieuse endémique est généralement latente, seuls quelques cas se déclarant sporadiquement. Elle peut néanmoins se manifester, épisodiquement, de façon plus dense, donnant lieu à une « endémoépidémie ».
- Epanchement pleural : présence de liquide entre les deux feuillets de la plèvre.
- Epidémie : Le mot épidémie (du grec epi, sur, et dêmos, peuple, littéralement « qui circule dans le peuple ») qualifie soit l'apparition d'un grand nombre de cas d'une nouvelle maladie, soit l'accroissement considérable du nombre de cas d'une maladie déjà existante, dans une région donnée, au sein d'une communauté ou d'une collectivité. Quand l'accroissement s'atténue, de façon plus ou moins rapide, c'est la fin d'une période appelée cycle de l'épidémie.
- Epistaxis : Saignement de nez.

- Exsudative : qui résulte du suintement liquide d'une partie des éléments du sang à travers la paroi d'un vaisseau. Un exsudat, riche en albumine et en leucocytes, est généralement consécutif à une inflammation des membranes qui entourent un organe ; responsable d'un épanchement, il remplit certaines cavités. Son caractère inflammatoire le différencie du transsudat, épanchement de liquide séreux ou albumineux purement mécanique.
- Gingivorragie : Saignement au niveau de la gencive.
- Hématémèse : Vomissement de sang d'origine digestive. Une hématémèse traduit une hémorragie digestive haute (sang plus ou moins digéré provenant de l'œsophage, de l'estomac ou du duodénum). Les causes les plus fréquentes en sont la rupture de varices œsophagiennes dues à l'hypertension portale chez un sujet atteint d'une cirrhose, les lésions favorisées par la prise de médicaments toxiques pour l'estomac (aspirine, anti-inflammatoires), l'ulcère gastroduodénal et les gastrites hémorragiques.
- Hématurie : Présence de sang dans l'urine.
- Hémostase : L'Hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements. Elle participe à la réparation de la brèche vasculaire et d'une façon générale, elle assure le maintien de l'intégrité des vaisseaux.
- Hyperémie conjonctivale : Vasodilatation excessive des petits vaisseaux de la conjonctive oculaire traduisant un phénomène inflammatoire qu'elle qu'en soit son origine (irritative, infectieuse, allergique, traumatique...).
- Hyperplasie : Augmentation bénigne du volume d'un tissu par multiplication des cellules qui le constituent. L'hyperplasie est l'une des causes de l'hypertrophie (augmentation du volume d'un tissu ou d'un organe).
- Ictère : Coloration jaune de la peau, de la sclérotique (blanc de l'œil) et des muqueuses, due à l'accumulation, dans le sang, de bilirubine (pigment dérivé de l'hémoglobine). L'ictère correspond au terme « jaunisse » du langage courant.
- Kaliémie : Taux de potassium dans le plasma sanguin.
- Macrophages à corps tingibles : Macrophages retrouvés de manière prédominante au niveau des centres germinatifs, contenant des corps apoptotiques et phagocytés à divers stades de dégradation.
- Méléna : Émission par l'anus de sang digéré (de couleur noire) par le tube digestif. Un méléna traduit une hémorragie digestive haute, c'est-à-dire provenant de l'œsophage, de l'estomac ou du duodénum. Il peut survenir soit isolément, en cas d'hémorragie digestive peu abondante et non extériorisée par voie haute, soit à la suite d'un vomissement de sang rouge (hématémèse).
- Méningoencéphalite : (méningo-encéphalite) Inflammation simultanée des méninges et de l'encéphale.
- Myalgie : Douleur musculaire. Les myalgies peuvent être dues à une hypertonie musculaire (raideur des muscles) ou à un traumatisme (courbatures d'effort, torticolis, lumbago). On les rencontre aussi dans diverses maladies, aiguës ou chroniques, d'origine infectieuse (grippe, hépatite virale, poliomyélite aiguë, maladie de Bornholm) ou auto-immune (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux). Des myalgies très importantes se déclarent également au cours de certains chocs septiques (faillite aiguë de la circulation sanguine, d'origine infectieuse).
- Néphrite interstitielle : Maladie caractérisée par une atteinte du tissu rénal interstitiel (tissu de soutien des néphrons).
- Œdème : Rétention pathologique de liquide dans les tissus de l'organisme, en particulier dans le tissu interstitiel.
- Pathogenèse : Étude du ou des mécanismes responsables du déclenchement et du développement d'une maladie.

- Paucisymptomatique : Paucisymptomatique est employé pour décrire l'état d'un patient qui ne présente que très peu de symptômes, sans pour autant que cela signifie que ce dernier ne soit pas atteint d'une quelconque pathologie.
- Pétéchie : Petite lésion rouge vif ou bleutée de la peau ou des muqueuses, caractéristique du purpura. Les pétéchies, dues au passage de globules rouges hors des vaisseaux sanguins, mesurent de 1 à 3 millimètres. Elles pâlisent avec le temps et peuvent laisser une pigmentation brune due aux dépôts de fer des globules rouges. Elles s'observent dans les thrombocytopénies (diminution du nombre des plaquettes sanguines), les thrombopathies (altération de la fonction des plaquettes) et les atteintes des vaisseaux sanguins.
- Phylogénétique : Le terme phylogénétique provient de "phylogénèse" qui est l'évolution des espèces. Phylogénétique est donc employé pour décrire un phénomène relatif à l'évolution des espèces.
- Phylogéographie : La phylogéographie qualifie l'étude des principes et processus qui gouvernent la distribution des lignées généalogiques intraspécifiques. Elle étudie les phénomènes génétiques et démographiques, en particulier les phénomènes de spéciation, ayant conduit à la distribution et à la structuration géographique actuelle des populations, faisant intervenir la paléogéographie.
- Pléomorphisme : Le pléomorphisme (du grec pléon : plus abondant, et morphê : forme) est la capacité que possède un organisme (essentiellement les bactéries) ou des cellules d'un organisme de revêtir des formes différentes dans certaines conditions ou sous des influences déterminées.
- Protéinurie : Présence de protéines dans les urines.
- Rhabdomyolyse : Destruction du tissu des muscles striés, entraînant la libération dans le sang d'un pigment musculaire toxique, la myoglobine. La rhabdomyolyse peut être provoquée par un traumatisme musculaire : traumatisme important avec écrasement (syndrome de Bywaters) ou, plus rarement, exercice musculaire intense, crises convulsives prolongées, électrocution. Il existe aussi des causes non traumatiques de rhabdomyolyse : interruption de la circulation sanguine dans un membre, alcoolisme aigu, infections (en particulier virales), prise de certains médicaments, maladies génétiques, etc. Une rhabdomyolyse se traduit par des douleurs des muscles atteints et une coloration foncée des urines. La destruction des cellules musculaires peut se compliquer d'une hyperkaliémie (excès de potassium dans le sang). La myoglobine est éliminée par les reins, et peut entraîner une insuffisance rénale aiguë.
- Thrombocytopénie : Affection caractérisée par un nombre de plaquettes sanguines au-dessous de la normale.
- Zoonose : Maladie de l'animal transmissible à l'homme.

Liste des abréviations

- ALT : alanine aminotransférase
- AMAV : virus Amapari
- APTT : temps de céphaline activée
- AST : aspartate aminotransférase
- BCNV : virus de Bear Canyon
- BMNC : cellules mononucléées de la moelle osseuse
- CDC : *Centers for disease Control and Prevention*
- CHPV : virus Chapare
- CIVD : coagulation intravasculaire disséminée
- CMH (I, II) : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
- CPA : cellule présentatrice d'antigène
- CPXV : virus Cupixi
- DAMP : *Damage-Associated Molecular Patterns*
- DC : cellule dendritique
- EGFR : *epidermal growth factor receptor*
- ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
- ESCRT : *endosomal sorting complexes required for transport*
- FHSP : fièvre hémorragique avec syndrome pulmonaire
- FHSR : fièvre hémorragique avec syndrome rénal
- FHV : fièvre(s) hémorragique(s) virale(s)
- FL : fièvre de Lassa
- GPC : complexe de glycoprotéines
- GTOV : virus Guanarito
- HGFR : *hepatocyte growth factor receptor*
- IFA : *immunofluorescence antibody test*
- IG : immunoglobuline
- INF-I (II, III) : interféron de type I, II, III.
- IPPYV : virus Ippy
- ISG : *interferon stimulated gene*
- JUNV : virus Junin
- L : polymérase
- LAMP1 : *lysosome associated membrane protein 1*
- LASV : virus Lassa
- LATV : virus Latino
- LCMV : virus de la chorioméningite lymphocytaire
- LCR : liquide céphalorachidien
- LDH : lactate deshydrogénase

- LPS : lipopolysaccharide
- LUJV : virus Lujo
- MACV : virus Machupo
- MOI : *multiplicity of infection*
- MOPV : virus Mopeia
- NGS : *Next Generation Sequencing* (séquençage de nouvelle génération)
- NK : cellules NK (Natural Killer)
- NP : nucléoprotéine
- OLVV : virus Oliveros
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé
- PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
- PBMC : cellules mononucléées du sang périphérique
- PFU : particule formant foyer ou *Particule Forming Unit*
- PI3K : phosphatidyl-inositol-3-kinase
- PKC : protéine kinase C
- PKR : protéine kinase R
- PML : *promyelotic leukemia protein*
- PRH : *proline-rich homeodomain protein*
- PRR : *Pattern recognition receptor*
- PT : taux de prothrombine
- RLR : *Recognition-like receptor*
- RNP : ribonucléoparticule(s)
- RT-qPCR : *reverse transcription - real time PCR (polymerase chain reaction)*
- SABV : virus Sabia
- SFTS : syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie
- SN : surdité neurosensorielle
- SNC : système nerveux central
- SSP : peptide signal stable
- STAT-1 : *signal transducer and activator of transcription 1 factor*
- TAMV : virus Tamiami
- TCRV : virus Tacaribe
- TfR1 : *human transferin receptor-1*
- TT : temps de thrombine
- WENV : virus Wenzhou
- WWAV : virus Whitewater Arroyo
- Z : protéine de matrice en doigt de zinc
- α -DG : α -dystroglycane

Résumé

Le virus Lassa entraîne une fièvre hémorragique endémique en Afrique de l'Ouest et représente un problème de santé publique. Les connaissances sur la pathogenèse et les réponses immunitaires associées à la maladie sont partielles. Nous avons suivi les paramètres pathologiques, virologiques et immunologiques associés aux infections létales et non létales du LASV chez le singe cynomolgus. Le tableau clinique a été caractérisé par une dépression, une anorexie, une perte de poids et une asthénie chez les animaux survivants, tandis que ces mêmes symptômes ont été accompagnés de fièvre, de difficultés respiratoires et d'épistaxis chez les animaux infectés par une dose létale. Seuls ces derniers ont montré une perturbation des paramètres de coagulation, une rhabdomyolyse et une hausse des marqueurs de lésions rénales. La peau au niveau du site initial d'infection a été le premier compartiment dans lequel le virus s'est répliqué, mais la dissémination virale dans les organes a ensuite été plus importante et plus rapide chez les animaux morts de la maladie, avec la présence de particules infectieuses plus nombreuses et des modifications anatomopathologiques plus sévères. Une réponse immunitaire innée et adaptative précoce et puissante a été associée avec le contrôle de l'infection et la survie tandis que les infections fatales ont été caractérisées par une réponse inflammatoire ressemblant au choc septique, un épuisement et une immunosuppression des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ ainsi qu'une réplication virale incontrôlée. Cette étude permet d'améliorer nos connaissances de la pathogenèse de la fièvre de Lassa et d'apporter des marqueurs d'infection prédictifs de l'issue la maladie.

Abstract

Lassa virus causes a hemorrhagic fever endemic in West Africa and represents a threat for civilians. The pathogenesis and the immune responses associated with the disease are poorly understood. We followed pathological, virological and immunological parameters associated with fatal and non-fatal Lassa virus infection in the cynomolgus monkey. The clinical picture was characterized by depression, anorexia, weight loss and asthenia in survivors whereas the same symptoms were supported by fever, respiratory difficulties and epistaxis in animals infected with the lethal dose. Only fatalities have shown coagulation parameters dysfunction, rhabdomyolysis and an increase of renal function markers. Skin at the injection site has been shown to allow the first replication cycle of LASV, but viral dissemination in organs was then more important and faster in fatalities, with the appearance of numerous infectious particles number and more severe pathologic changes. Early and robust innate and adaptive immune response has been associated with the control of infection and recovery whereas fatal infections were characterized by a sepsis-like inflammatory response, exhaustion and immunosuppression of CD8⁺ and CD4⁺ T cells as well as uncontrolled viral replication. This study sheds light on the pathogenesis of Lassa fever and reveals infection markers predictive of the disease outcome.

Introduction : Etat de l'art

I. Les fièvres hémorragiques virales

I.1. Définition

Les fièvres hémorragiques virales (FHV) sont des zoonoses causées par quatre familles virales distinctes : Arenaviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae et Filoviridae. FHV est un terme général désignant une maladie sévère, avec un tableau clinique commun caractérisé, entre autres, par la fièvre, des myalgies et une prostration, suivi dans les cas plus sévères par des coagulopathies caractérisées par des pétéchies, des œdèmes et parfois des saignements. Des symptômes gastro-intestinaux (diarrhées, vomissements, douleurs abdominales) sont souvent observés. Des dommages de l'endothélium vasculaire, des œdèmes pulmonaires et des lésions hépatiques sont également communs aux FHV. Il est important de noter que si le tableau clinique des FHV présente des similitudes, la diversité et l'intensité des symptômes sont très variables ^[1].

Les familles virales induisant des FHV partagent certaines caractéristiques, notamment le fait d'être constituées de virus à ARN enveloppés. Leur maintien dans la nature est strictement dépendant d'un animal ou d'un insecte vecteur. Par conséquent, la zone d'endémicité de chacun de ces virus est restreinte à la zone où vivent leurs réservoirs hôte ou leurs vecteurs. L'Homme ne constitue le réservoir d'aucun de ces virus. Il représente un hôte accidentel ou un hôte intermédiaire, infecté à la suite d'un contact avec le réservoir hôte ou le vecteur. Cependant la transmission interhumaine de certains de ces virus est fréquente. Dans la grande majorité des cas, les épidémies humaines de FHV se produisent de manière sporadique et irrégulière, rendant difficile leur prédiction. A l'exception de quelques virus, il n'existe pas de traitements ni de vaccins commercialisés contre les FHV.

Les FHV constituent des maladies émergentes et réémergentes chez l'Homme. Leur apparition est due à plusieurs facteurs d'émergence qui facilitent la possibilité de contacts entre les hommes et le réservoir de l'agent infectieux. Ces facteurs sont l'environnement, l'agent infectieux, le vecteur et l'hôte accidentel ou intermédiaire (l'Homme). Les facteurs environnementaux susceptibles de favoriser l'émergence comprennent les changements climatiques,

l'urbanisation, l'augmentation de la démographie, la déforestation, l'évolution des techniques agricoles, les déplacements de populations (guerres, réfugiés) etc... . Les facteurs liés aux vecteurs comprennent la résistance aux pesticides, le déplacement des réservoirs, la prédation et le réchauffement climatique ^[2]. Les principales familles de virus responsables de FHV sont détaillées ci-dessous et résumées dans le **Tableau 1**.

I.2. Fièvres hémorragiques dues aux Arenaviridae

Les *Arenaviridae* sont composés des Mammarrénavirus et des Reptarénavirus. Les Mammarrénavirus sont divisés en deux groupes, les Mammarrénavirus du nouveau monde et ceux de l'ancien monde. Ces virus sont généralement transmis par les rongeurs et chaque virus est associé à une espèce de rongeur dans lequel il est maintenu. Pas moins de huit Arénavirus sont responsables de FHV induisant une maladie modérée à sévère chez l'Homme ^[1]. Les fièvres hémorragiques à Arénavirus sont davantage décrites en section II.1.

I.3. Fièvres hémorragiques dues aux Bunyaviridae

Les *Bunyaviridae* sont des virus à ARN tricaténaires simple brin de polarité négative. Cette famille de virus possède plusieurs genres responsables de fièvres hémorragiques qui ont pris de l'importance au cours des dix dernières années en raison de leur identification hors des régions où ils étaient autrefois endémiques. Les virus Hantaan et Seoul, deux Hantavirus, sont transmis par des rongeurs et causent près de 200 000 fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FHSR) chaque année, avec un taux de mortalité compris entre 1 et 16% en Asie et à l'est de la Russie ^[3]. Le virus Puumala est responsable d'une forme atténuée de FHSR très répandue en Europe centrale et en Europe de l'est. Les virus Sin Nombre et Andes sont, quant à eux, responsables de fièvres hémorragiques à syndrome pulmonaire (FHSP) en Amérique du Sud et du Nord, respectivement ^[4].

Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo (CCHF) est un *Nairovirus* qui cause une maladie sévère chez l'Homme, avec un taux de mortalité de 30 à 40%. Ce dernier est hébergé par des tiques et sévit en Afrique, Asie, Europe de l'Est et Centrale ainsi que dans les pays du Moyen Orient. Cette maladie a été décrite pour la première fois au début de la seconde guerre mondiale chez des militaires soviétiques en opération en Crimée ^[5]. Le virus responsable de la maladie n'a été isolé que plus tard au Congo, en 1956, chez un patient fébrile ^[6].

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift est un *Phlebovirus* transmis par les moustiques et responsable d'épidémies en Afrique de l'est et dans la péninsule arabique. Ce virus, isolé en 1930, induit une forte mortalité chez les ruminants et un syndrome grippal modéré chez l'Homme, pouvant évoluer vers des encéphalites ou des atteintes hémorragiques graves dans 1% des cas ^[7]. Enfin, le virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopenie (SFTS), un autre *Phlebovirus*, a récemment émergé en Chine et au Japon avec un taux de mortalité compris entre 12 et 30%. Le cycle de ce virus n'est toujours pas connu mais il est supposé que les animaux domestiques représentent le réservoir et la tique, le vecteur ^[8].

I.4. Fièvres hémorragiques dues aux Flaviviridae

Les *Flaviviridae* sont des virus enveloppés avec un matériel génétique composé d'un brin d'ARN de polarité positive. Un seul genre de cette famille de virus est responsable de FHV : les *Flavivirus*, dont le vecteur est un arthropode (principalement moustiques et tiques). Le virus de la Dengue est la FHV la plus répandue à travers le monde, avec de nouveaux cas identifiés dans des zones non endémiques, aux Etats Unis et en Europe. Entre 50 et 100 millions de cas de dengue sont rapportés chaque année, parmi lesquels 500 000 cas de fièvres hémorragiques, avec une mortalité comprise entre 1 et 5% ^[9]. Le virus de la fièvre jaune est la seconde FHV la plus distribuée à travers le monde, induisant 200 000 nouveaux cas par an avec un taux de mortalité compris entre 15 et 30%. Malgré l'existence d'un vaccin contre la fièvre jaune, le nombre de personnes infectées a augmenté ces dernières années, notamment dans les principales zones urbaines d'Afrique ^[10]. Le virus de la maladie de la forêt de Kyasanur, un autre *Flavivirus*, circule chez les mammifères et les oiseaux en Inde, Arabie Saoudite et en Chine. Le virus est transmis à l'Homme par les tiques, causant une maladie fébrile grave avec des symptômes hémorragiques possibles. La morbidité est de 500 cas par an et la mortalité est supérieure à 30% ^[11]. Le virus Alkhurma a été identifié en Arabie Saoudite en 1995 et entraîne une FHV chez l'Homme avec un taux de mortalité supérieur à 25%. La transmission virale aurait lieu par contacts directs avec le sang de bétails infectés (moutons et chameaux). Bien que le virus ait été isolé chez les tiques, il semblerait qu'il soit transmis par les moustiques ^[12,13]. Enfin le virus Omsk est un *Flavivirus* ayant émergé entre 1945 et 1948 en Sibérie, entre les villes d'Omsk et de Novosibirsk. Le virus est également transmis par les tiques et par contact avec des rats. L'épidémiologie de cette FHV est encore inconnue et fait intervenir plusieurs hôtes. Le taux de létalité est faible (0,53 à 3%) ^[14].

I.5. Fièvres hémorragiques dues aux Filoviridae

Parmi les virus responsables de fièvres hémorragiques, les virus Marburg et Ebola sont les plus médiatisés en raison de la crainte qu'ils génèrent et de leur taux de mortalité très élevé (jusqu'à 90% selon les souches). A l'origine, les épidémies à *Filovirus* provenaient des régions centrales de l'Afrique et étaient sporadiques, allant de quelques dizaines à plus de 400 cas. Cependant, cette particularité a changé en Décembre 2013 lorsqu'une épidémie sans précédent, causée par la souche Zaire du virus Ebola, a émergé dans des pays d'Afrique de l'Ouest, notamment en Guinée, Sierra Leone et au Liberia. Cette épidémie s'est terminée en Janvier 2016 avec plus de 28 000 cas et plus de 11 000 morts ^[15]. L'espèce marburgvirus contient deux virus, le virus Marburg et le virus Ravn, qui possèdent de fort taux de mortalité (90%). Le genre *Ebolavirus* contient 5 espèces avec un taux de mortalité compris entre 40 et 90% ^[16]. Les chauves-souris jouent un rôle important dans le maintien des *Filovirus* dans la nature, puisque *Rousettus aegyptiacus* constitue le réservoir du virus Marburg et *Epomops franqueti* et *Hypsignathus monstrosus* ont été suggérés comme réservoirs du virus Ebola Zaire ^[17,18].

I.6. Impact des fièvres hémorragiques virales

Pas moins de 20 virus sont responsables de fièvres hémorragiques, dont la plupart sont représentées en **Figure 1** (Zapata et al. ^[19]). Leur incidence croissante et la difficulté de diagnostic constitue un risque pour la population. De plus, la plupart de ces FHV sont des pathogènes de groupe à risque 4, pour lesquels il n'existe aucun traitement utilisable sur le terrain. En raison de leur forte mortalité, de leur importante propagation et de l'absence de moyens thérapeutiques ou prophylactiques efficaces, les virus induisant des fièvres hémorragiques sont considérés par le CDC comme des agents de bioterrorisme de catégorie A, la plus haute classe de risque pour la sécurité publique ^[20]. Ces virus, y compris le virus Lassa, doivent être manipulés dans un laboratoire de confinement de niveau 4.

Le sujet de cette thèse portant sur la fièvre de Lassa, seuls les Arénavirus seront abordés par la suite.

Virus			Vecteur	Maladie
Famille	Genre	Virus		
Flaviviridae	<i>Flavivirus</i>	Dengue	Moustiques <i>Aedes</i>	Dengue
		Fièvre jaune	Moustiques <i>Aedes</i> et <i>Haemagogus</i>	Fièvre jaune
		Maladie de la forêt de Kyasanur	Tiques	Fièvre de Kyasanur
		Alkhumra	Tiques	FH d'Alkhumra
		Omsk	Tiques	FH d'Omsk
Bunyaviridae	<i>Hantavirus</i>	Hantaan	Rongeur <i>Apodemus</i>	FHSR
		Séoul	Rongeur	
		Puumala	Rongeur <i>Clethrionomys</i>	
		Sin Nombre	Rongeur	FHSP
		Andes	Rongeur	
	<i>Nairovirus</i>	Fièvre hémorragique de Crimée Congo	Tiques	FH de Crimée Congo
	<i>Phlebovirus</i>	Fièvre de la vallée du Rift	Moustiques	Fièvre de la Vallée du Rift
Syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie		Tiques	Syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie	
Arenaviridae	Cf. Tableau 2			
Filoviridae	<i>Filovirus</i>	Marburg	Chauve-souris <i>Rousettus aegyptiacus</i>	FH de Marburg
		Ebola	Chauve-souris <i>Epomops franqueti</i> et <i>Hypsignathus monstrosus</i> (Ebola Zaïre)	Maladie à virus Ebola

Tableau 1 : Récapitulatif des virus responsables de FHV

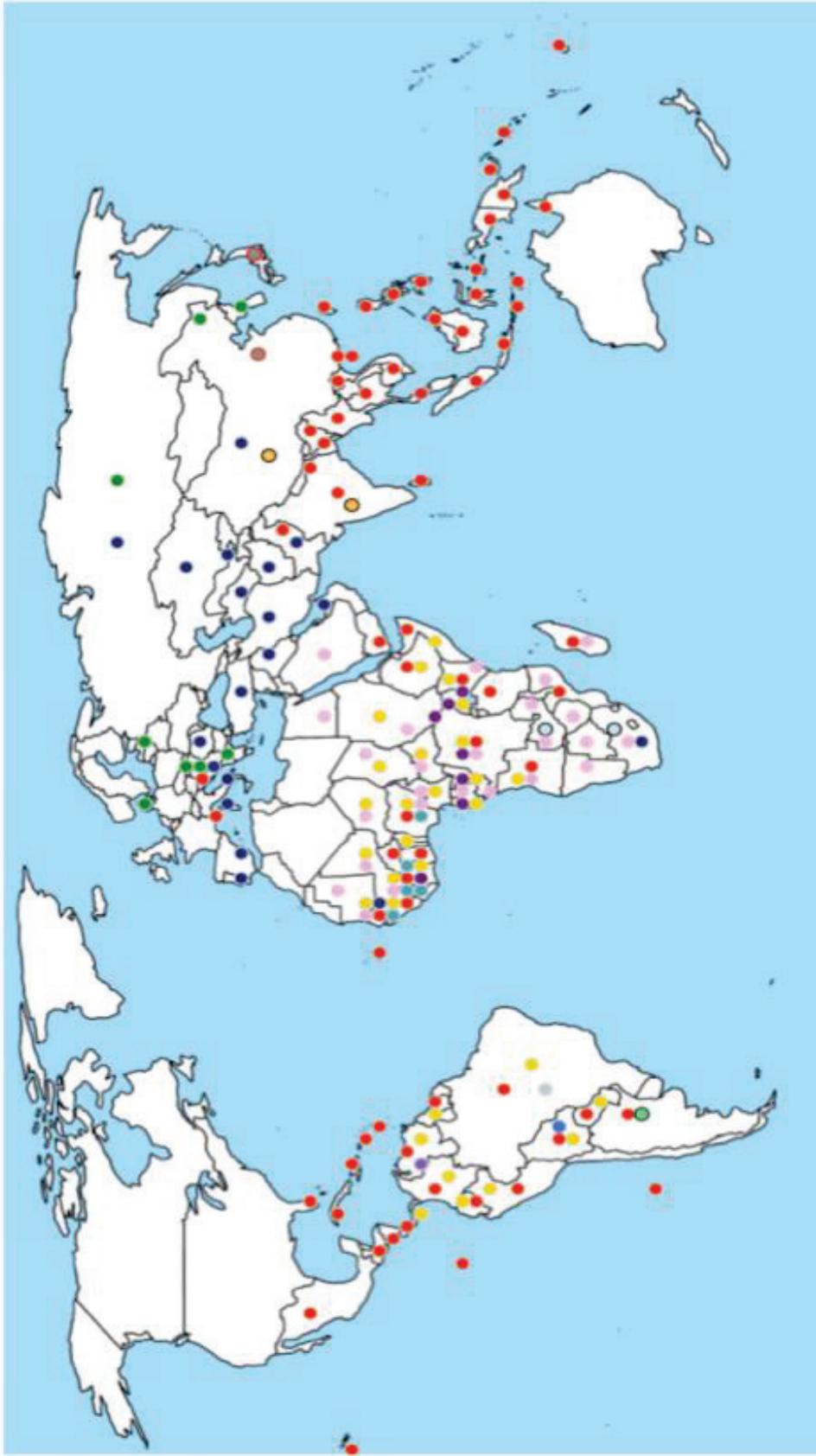


Figure 1 : Distribution géographique des fièvres hémorragiques virales (HHV). La carte montre la zone d'apparition de certains virus de fièvres hémorragiques.

II. Epidémiologie de la fièvre de Lassa

II.1. Aperçu sur les Arénavirus

II.1.a. Généralités

Les Arénavirus appartiennent à la famille des *Arenaviridae*. Ce sont des virus zoonotiques à ARN de polarité négative avec comme principal réservoir naturel les rongeurs de la famille des muridés (rats et souris). Le virus Tacaribe (TCRV) est cependant une exception car il est le seul Arénavirus à avoir été isolé chez la chauve-souris du genre *Artibeus* ^[21]. Le genre Arénavirus a été pendant longtemps unique parmi les *Arenaviridae* mais ce paradigme a été revisitée depuis 2015 lorsque plusieurs équipes ont détecté et isolé un groupe divergent d'Arénavirus chez des serpents en captivité (ordre des *Aléthinophidiens*) ^[22]. Par conséquent, les Arénavirus ont été reclassés en deux nouveaux genres : les Mammarrénavirus et les Reptarénavirus en fonction de leurs espèces hôtes, respectivement les petits mammifères et les serpents. Les Reptarénavirus regroupent trois nouvelles espèces de virus pour lesquels peu d'éléments sont connus, et constituent donc un ordre isolé qui ne sera pas abordé dans cette thèse.

Le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) est le prototype des Mammarrénavirus (simplifié par la suite par Arénavirus). Il a été le premier virus du genre à avoir été isolé (1933 - St. Louis, USA) ^[23]. Ce dernier, phylogénétiquement proche des *Bunyaviridae* et des *Orthomyxoviridae*, peut causer une méningite ou une méningo-encéphalite chez l'Homme ainsi que de nombreuses malformations chez le fœtus ^[24]. Depuis les années cinquante, de nombreux virus ont été découverts avec une morphologie et des caractéristiques proches du LCMV. Ceci a amené à la reconnaissance de la famille des *Arenaviridae*, un nom dérivé du mot latin *arenosus* signifiant « sable », due à l'apparence sablonneuse des ribosomes souvent empaquetés dans les particules virales ^[25]. Depuis, de nouveaux Arénavirus continuent d'être isolés avec une grande fréquence et une diversité importante de pathogénicité (Cf. **Tableau 2**). Récemment, deux nouveaux Arénavirus ont été pour la première fois isolés chez un rongeur en Asie, le virus Wenzhou (WENV) en Chine et un variant génétique du WENV au Cambodge, soulignant le fort potentiel d'émergence que peuvent avoir les Arénavirus ^[26,27].

Virus	Acronyme	Distribution	Réservoirs	Mortalité	Identification chez l'Homme
Arénavirus de l'ancien monde					
Chorioméningite lymphocytaire	LCMV	Europe, Amériques	<i>Mus musculus</i>	Faible	Oui
Ippy	IPPYV	Rep. Cen. Afr.	<i>Arvicanthis sp.</i>	-	Non
Lassa	LASV	Afrique de l'Ouest	<i>Mastomys sp.</i>	Forte	Oui
Lujo	LUJV	Zambie, Afrique du Sud	?	Forte	Oui
Luna	LUNV	Zambie	<i>Mastomys natalensis</i>	-	Non
Lunk	LNKV	Zambie	<i>Mus minutoides</i>	-	Non
Merino Walk	MWV	Afrique du Sud	<i>Myotomys unisulcatus</i>	-	Non
Mobala	MOBV	Rep. Cen. Afr.	<i>Praomys sp.</i>	-	Non
Mopeia	MOPV	Mozambique, Zimbabwe	<i>Mastomys natalensis</i>	-	Non
Morogoro	MORV	Mozambique, Zimbabwe	<i>Mastomys natalensis</i>	-	Non
Kodoko	KODV	Afrique	<i>Mus minutoides</i>	-	Non
Arénavirus du nouveau monde					
Allpahuayo	ALLV	Pérou	<i>Oecomys bicolor-paricola</i>	-	Non
Amapari	AMAV	Brésil	<i>Oryzomys capito, Neacomys guianae</i>	-	Non
Bear Canyon	BCNV	USA	<i>Peromyscus californicus</i>	-	Non
Chapare	CHPV	Bolivie	?	Forte	Oui
Cupixi	CPXV	Brésil	<i>Oryzomys sp.</i>	-	Non
Flexal	FLEV	Brésil	<i>Oryzomys sp.</i>	Faible	Oui
Guanarito	GTOV	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Forte	Oui
Junin	JUNV	Argentine	<i>Calomys musculinus</i>	Forte	Oui
Latino	LATV	Bolivie	<i>Calomys callosus</i>	-	Non
Machupo	MACV	Bolivie	<i>Calomys callosus</i>	Forte	Oui
Oliveros	OLVV	Argentine	<i>Bolomys obscurus</i>	-	Non
Parana	PARV	Paraguay	<i>Oryzomys buccinatus</i>	-	Non
Pichinde	PICV	Colombie	<i>Oryzomys albigularis</i>	-	Oui
Pirital	PIRV	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	-	Non
Sabia	SABV	Brésil	?	?	Oui
Tacaribe	TCRV	Trinidad	<i>Artibeus spp.</i>	Faible	Oui
Tamiami	TAMV	USA	<i>Sigmodon hispidus</i>	Faible	Oui
Whitewater Arroyo	WWAV	USA	<i>Neotoma albigula</i>	Forte	Oui
Wenzhou	WENV	Chine	<i>Rattus sp.</i>	-	Non

Tableau 2 : La famille des Arenaviridae

« - » : aucune pathogénicité reporté chez l'Homme à ce jour.

II.1.b. Phylogénie et évolution

Dans la nature, les Arénavirus entraînent une infection chronique chez leur espèce hôte respective sans causer de maladie évidente chez celle-ci. L'écologie de ces espèces réservoirs et leur distribution géographique expliquent la localisation précise des différentes épidémies dues aux Arénavirus, à l'exception du LCMV qui est réparti à travers le monde en raison de la répartition ubiquitaire de son réservoir hôte. Sur la base de leurs propriétés antigéniques, phylogénétiques et de leur distribution géographique, pas moins de 30 Arénavirus sont subdivisés en deux lignages : les Arénavirus de l'Ancien Monde et les Arénavirus du Nouveau Monde (Cf. **Tableau 2**).

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences des différents gènes ou sur la séquence complète des segments génomiques ont permis de clairement définir les relations qui existent parmi toutes les espèces d'Arénavirus (Cf. **figure 2**). Ces derniers représentent 5 groupes phylogénétiques différents. Les Arénavirus de l'Ancien Monde contiennent les virus circulants en Afrique, en Europe et en Asie. Ils forment un groupe monophylétique parmi lesquels les virus Lassa (LASV), Mopeia (MOPV), Mobala (MOBV) et Ippy (IPPYV) sont proches tandis que le LCMV est plus éloigné. Le virus Lujo (LUJV), récemment découvert, est plus proche des virus de l'ancien monde mais contient des éléments de séquence du gène de la glycoprotéine des virus du Nouveau Monde ^[28]. Les Arénavirus du Nouveau Monde comprennent les virus circulant en Amérique du Nord et en Amérique du Sud. Ils sont subdivisés en 4 clades phylogénétiques A, B, C et A/rec. Le clade A inclut plusieurs virus non pathogènes d'Amérique du Sud. Le clade B regroupe les virus responsables de FHV : le virus Chapare (CHPV), Guanarito (GTOV), Junin (JUNV), Sabia (SABV), Machupo (MACV), et des virus non pathogènes comme les virus Amapari (AMAV), Tacaribe (TCRV) et Cupixi (CPXV). Le clade C est composé des virus Latino (LATV) et Oliveros (OLVV). Des événements de recombinaison au sein d'un même segment génomique ou entre les segments peuvent avoir influencé l'évolution de certains Arénavirus. Les gènes codant pour la nucléoprotéine et la glycoprotéine des virus de Bear Canyon (BCNV), Tamiami (TAMV) et de Whitewater Arroyo (WWAV) provenant d'Amérique du Nord ont une histoire phylogénétique divergente. Des analyses de la séquence complète en acides aminés ont révélé que la nucléoprotéine de ces virus était liée à celle des Arénavirus du nouveau monde du clade A alors que la glycoprotéine était plus proche de celle des virus du clade B ^[29]. Ces virus sont donc regroupés dans un autre clade, le clade A/rec.

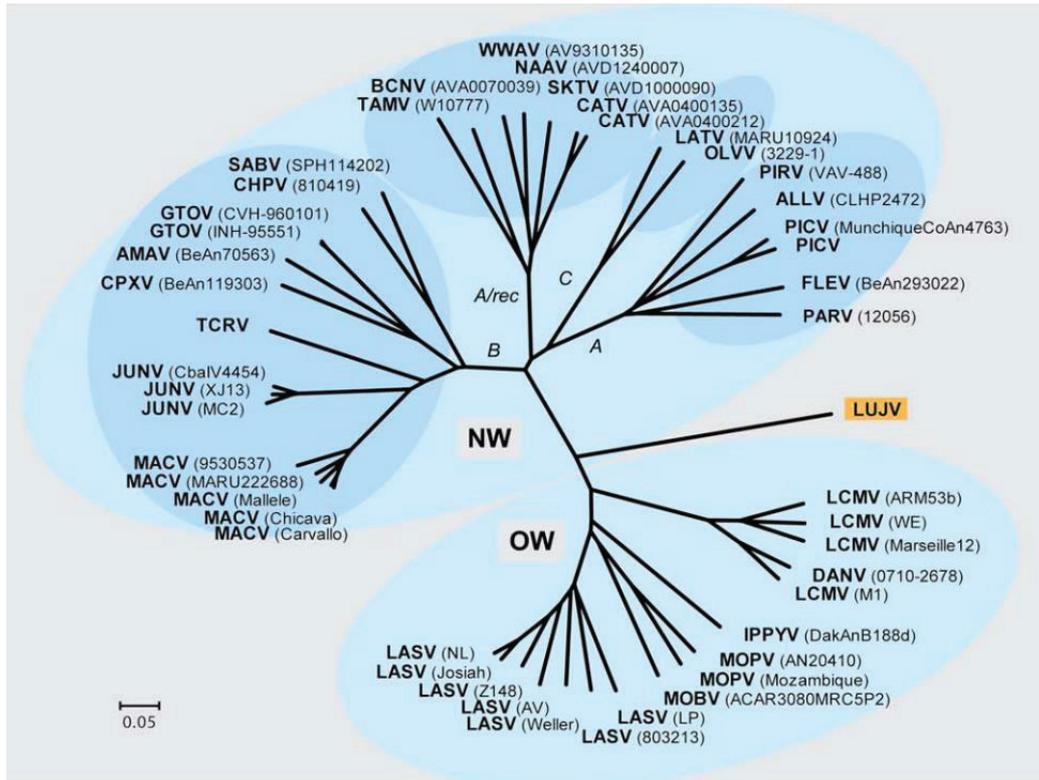


Figure 2 : Analyse phylogénétique des Arénavirus. D'après Briese et al [28].

Les relations phylogénétiques comparées des virus se basent sur la séquence nucléotidique complète du segment S (Small). Les analyses ont été réalisées via les algorithmes de neighbour-joining appliqué au modèle de Jukes-Cantor. L'échelle correspond au nombre de substitutions par site.

II.1.c. Fièvres hémorragiques à Arénavirus

La famille des *Arenaviridae* comporte aujourd'hui huit espèces virales responsables de FHV, dont deux parmi les virus de l'Ancien Monde et cinq parmi ceux du Nouveau Monde (Cf. **figure 3**). Il s'agit de la famille virale comportant le plus large éventail d'espèces induisant des FHV. Ils ont été classés par le CDC comme des pathogènes de catégorie A dont la manipulation requiert un confinement de sécurité de niveau 4. Le virus Lassa, détaillé en paragraphe I.2, est l'Arénavirus le plus important en termes d'impact humain avec plusieurs dizaines de milliers d'infections et plusieurs milliers de morts chaque année. Isolé en Octobre 2008 dans un hôpital en Afrique du Sud, le LUJV a tué quatre personnes sur les cinq infectées ; la personne survivante ayant reçu un traitement, la ribavirine [28]. En Amérique du Sud sévissent cinq Arénavirus du Nouveau Monde également responsables de FHV chez l'Homme. Le CHPV a été isolé en Bolivie en 2008, tuant la seule personne infectée [30]. Le MACV, découvert également en Bolivie en 1967, est responsable de la fièvre hémorragique Bolivienne [31]. Le JUNV, responsable de la Fièvre Hémorragique d'Argentine, a été isolé pour la première

fois en 1955 et son taux de mortalité est estimé entre 15 et 30% ^[32]. Le GTOV, isolé au Venezuela en 1989, est responsable de plusieurs centaines d'épidémies depuis plus de vingt ans avec un taux de mortalité moyen de 23% ^[33]. Le SABV a émergé en 1990 à Sao Paulo au Brésil et a été isolé à partir de l'unique victime ^[34]. Enfin, le WWAV a été identifié en 2000 en Californie, causant 3 cas fatals ^[35].

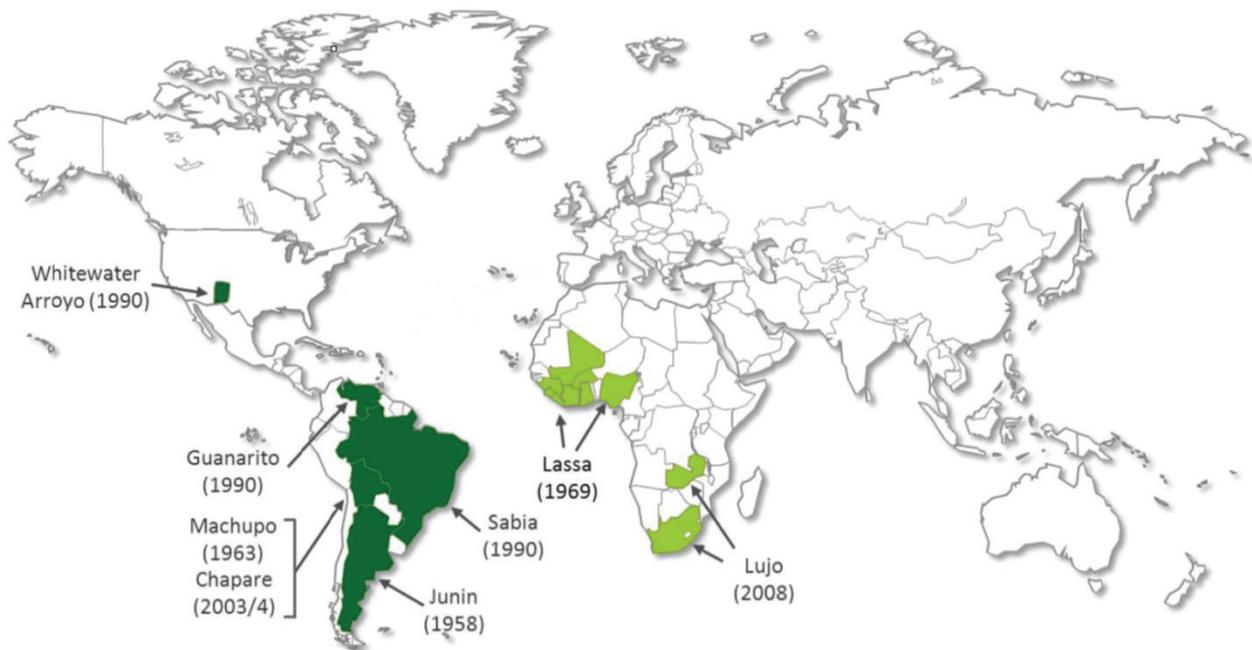


Figure 3 : Distribution géographique des FHV à Arénavirus. D'après S. Fehling *et al* ^[36].

II.2. Epidémiologie de la fièvre de Lassa

II.2.a. La fièvre de Lassa dans les pays endémiques et limitrophes

Le virus Lassa est l'agent étiologique de la fièvre de Lassa (FL) et certainement l'Arénavirus le plus préoccupant. Cette maladie est une FHV qui a été décrite pour la première fois en 1969 au cours d'une épidémie entraînant la mort de deux infirmières missionnaires en service dans le village de Lassa au nord-est du Nigeria ^[37]. Le LASV a ainsi pu être isolé pour la première fois en 1972 à partir de ces patientes via des prélèvements oropharyngés, de fluides pleuraux, de plasma ou encore d'urine ^[38]. Il ressort de comptes rendus cliniques que la FL sévissait probablement, sans avoir été décelée comme telle, bien avant que le premier cas ait été confirmé en 1969. En effet, de 1920 à 1950, de nombreux cas ressemblant cliniquement au ty-

plus avaient été répertoriés en Afrique de l'Ouest. La confirmation de l'agent étiologique responsable du typhus n'a été que très rarement obtenue en laboratoire mais les symptômes des individus touchés suggèrent qu'il s'agissait de la FL. La détection en 1971 d'anticorps neutralisants spécifiques du LASV chez une missionnaire du Nigéria, qui avait guéri d'une maladie très proche en 1952, confirme l'hypothèse d'une origine de la FL plus ancienne que sa découverte ^[39].

Depuis la découverte du virus jusqu'en 1975, la maladie avait été identifiée dans 3 pays d'Afrique de l'Ouest : Le Nigéria, le Libéria et la Sierra Leone. En l'espace de 6 ans, 323 cas avaient été officiellement déclarés dans ces pays, dont 2 résultants d'une infection contractée en laboratoire. A noter que ce chiffre est certainement sous-estimé en raison des capacités de diagnostic de l'époque qui ne permettaient d'identifier une flambée épidémique que si au moins 3 patients présentaient des symptômes. Les années qui suivirent ont vu l'amélioration des moyens de diagnostic et par conséquent une meilleure détection des cas de FL. Plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest ont ainsi été identifiés comme endémiques au LASV, notamment la Guinée, la Sierra Leone, le Libéria et le Nigéria (Cf. **figure 4**) ^[40-41-42-43]. Cependant, des cas avérés de FL ont également été identifiés chez des patients issus des pays limitrophes notamment la Côte d'Ivoire, le Sénégal, le Bénin, le Mali, le Burkina Faso et le Ghana ^[44-45-46]. Des anticorps anti-LASV ont également été identifiés hors de l'Afrique de l'Ouest chez des patients issus de la République Centrafricaine et de la République du Congo, suggérant une expansion importante de la zone de distribution du LASV ^[47]. Il faut cependant être prudent avec ces résultats en raison de la spécificité relative des sérologies.

Récemment, le LASV a été responsable d'une forte flambée épidémique depuis juin 2017 dans 18 états du Nigéria, avec 651 cas confirmés et 106 morts. Avant cela, l'organisation mondiale de la santé (OMS) avait déclaré une autre épidémie de FL dans le même pays d'août 2015 à mai 2016 dont le bilan s'établissait à 273 cas pour 149 victimes répartis dans 23 états. Une autre épidémie a également frappé le Bénin de Janvier à Mai 2016 avec 54 cas pour 28 décès. Cette épidémie survenait après que le Togo et le Burkina Faso aient reporté des cas sporadiques de FL. Ces réémergences continues de FL dans des zones d'Afrique de l'Ouest, et qui ont tendance à s'étendre, soulignent le problème de santé publique causé par le LASV. En effet, ce dernier a le plus fort impact humain parmi toutes les FHV avec 300 000 infections et plus de 5000 décès annuels estimés dans les pays endémiques ^[48]. Ces données officielles sont issues d'une étude effectuée en Sierra Leone dans les années 1980 et sont probablement obsolètes aujourd'hui. Des études prospectives axées sur la région d'endémicité au virus esti-

ment à 59 millions le nombre de personnes séronégatives à risque de contracter une primo infection par le LASV [49]. Des analyses spatiales portées sur la zone de distribution actuelle du LASV ont montré que ce dernier couvrait environ 80% de la surface totale de la Sierra Leone et du Libéria, 50% de celle de la Guinée, 40% de celle du Nigeria, 30% de celle de la Côte d'Ivoire, du Togo et du Bénin, et 10% de celle du Ghana, représentant une région comprenant environ 200 millions de personnes à risque [50]. Cependant, la prévalence d'anticorps dirigés spécifiquement contre le virus est très variable chez les populations résidentes dans les pays endémiques. Elle est comprise entre 8% et 52% de la population en Sierra Leone [51], 4% et 55% en Guinée [41] et 21% au Nigéria [52], démontrant que la plupart des infections sont paucisymptomatiques, voire asymptomatiques et ne nécessitent pas d'hospitalisation. Ceci est également confirmé par la séroconversion spécifique au LASV au sein de la population non immunisée dans ces pays qui est comprise entre 5% et plus de 20% par an [53].

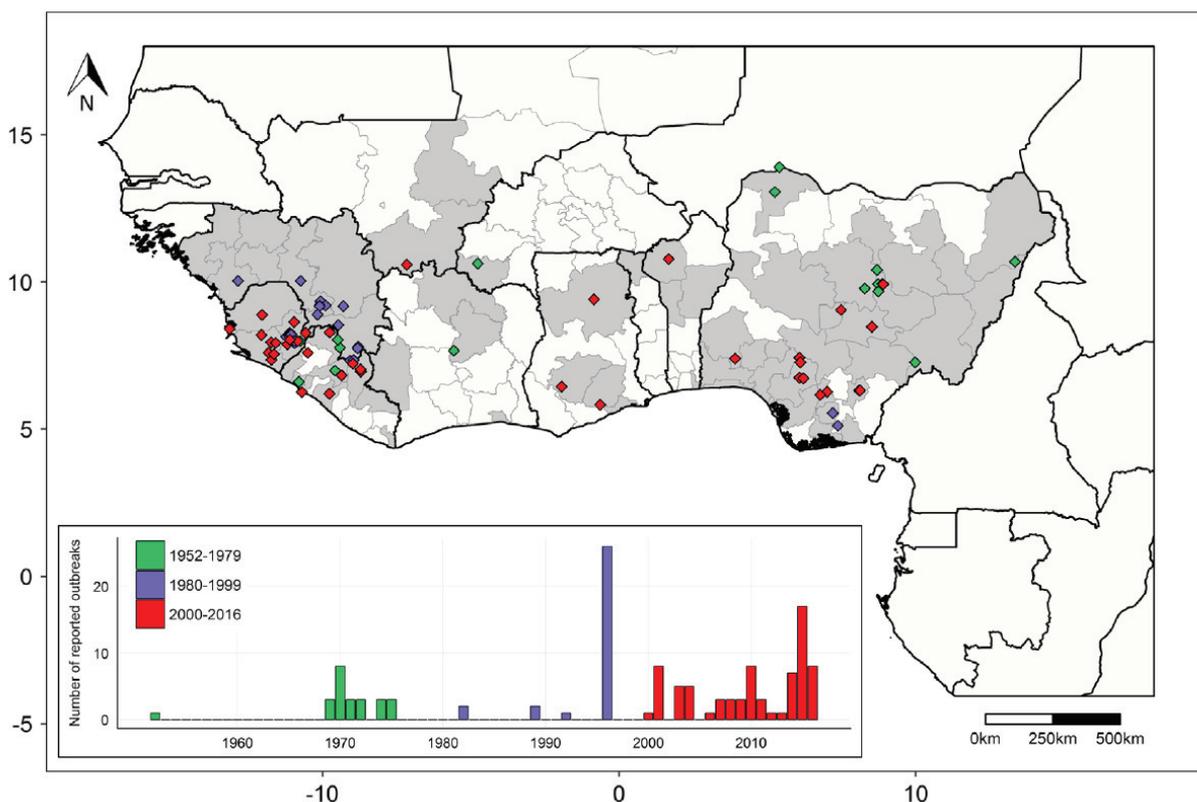


Figure 4 : Distribution du virus Lassa en Afrique de l'Ouest. D'après Rory Gibb *et al* [54]. Les points sur la carte représentent les épidémies confirmées et suspectées de FL de 1952 à 2016 ($n = 102$) (colorés par période de temps). La coloration grise représente les régions où le LASV a été identifié, chez l'Homme ou le rongeur). L'histogramme rapporte le nombre d'épidémies de FL par année ($n = 129$).

II.2.b. Les cas d'importation de FL

De manière attendue, la majorité des cas importés de FL proviennent du Nigéria, du Libéria, de la Sierra Leone et de la Guinée ^[44]. Plus de 30 cas de maladies importées ont été recensés à travers le monde parmi lesquels un tiers a été fatal et avec une moyenne d'un cas importé chaque année depuis les années 2000 ^[55], faisant de la FL la FHV la plus exportée hors de sa zone d'endémicité (Cf. **Tableau 3**). Parmi ces exportations, au moins 3 cas proviennent des pays limitrophes. En 1980, un cas non fatal de FL a été diagnostiqué aux Pays Bas chez une bénévole opérant au Burkina Faso ^[44]. En 2000, Gunther *et al.* caractérisait une souche unique du LASV (AV) isolée à partir d'un cas fatal. Cette patiente de nationalité allemande avait voyagé au Ghana, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso ^[46]. Une décennie plus tard, un scénario similaire se produisit avec un patient évacué du Mali vers le Royaume Uni après 10 jours de fièvre et une malaria qui ne répondait pas au traitement. Rapidement après son rapatriement à l'Hôpital Universitaire de Londres, le patient mourrait d'une défaillance multiviscérale. Un nouveau diagnostic post mortem de la malaria a été effectué avec un résultat négatif mais celui du LASV a été confirmé simultanément ^[45]. L'analyse du séquençage viral a révélé que la souche du cas Malien était plus proche phylogénétiquement de la souche AV du cas allemand. Contrairement à la patiente allemande, le britannique résidait uniquement au Mali, dans une région à la frontière de la Côte d'Ivoire. Plus tard en 2011, l'OMS déclarait la toute première épidémie de FL au Ghana chez trois patients locaux résidant dans des régions distinctes du pays. Bien que l'origine de la souche AV ne soit pas encore définie, il est évident qu'elle provient d'une région où la FL n'avait pas encore été identifiée auparavant. Ces différents cas cliniques suggèrent une nouvelle fois une expansion de la zone de circulation du LASV. Des études de terrain ont d'ailleurs confirmé cette notion en démontrant la présence de rongeurs infectés par LASV ainsi que des transmissions épizootiques dans le village de Soromba au Mali ^[56]. L'identification du LASV dans ces zones géographiques n'est pas surprenante. En effet, le sud du Mali, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire, le Togo, le Bénin et le Ghana partagent les mêmes caractéristiques écologiques que les pays où le LASV est endémique car ils font tous partis de l'écozone afrotropicale. Les facteurs environnementaux (humidité, température) dans cette zone favorise probablement la circulation du LASV et de son réservoir hôte ^[50]. Récemment, pendant l'épidémie de FL au Togo en 2016, le directeur médical d'un centre de santé est décédé après avoir été rapatrié en Allemagne. Un employé des pompes funèbres, chargé de sa dépouille, a été diagnostiqué avec le virus. Il s'agit du premier cas d'infection par le virus de Lassa survenu en dehors du continent africain ^[57].

Année	Origine	Exportation	Age	Genre	Profession	Issue	Note
1969	Nigeria	USA	52	F	Infirmier(e)	S	
1971	SL	RU	NS	F	Infirmier(e)	S	
1971	SL	RU	NS	M	Médecin	S	
1972	SL	RU	35	F	Infirmier(e)	S	
1974	Nigeria	Allemagne	33	M	Médecin	S	
1975	SL	USA	39	F	Bénévole	S	
1975	Nigeria	RU	39	M	Médecin	M	Décès J8
1976	Nigeria	RU	NS	M	Ingénieur(e)	S	
1976	SL	USA	43	F	Bénévole	S	
1980	BF	Pays Bas	34	M	Bénévole	S	
1981	Nigeria	RU	18	F	Professeur	S	
1982	Nigeria	RU	21	F	Diplomate	S	
1984	SL	RU	NS	M	Géologue	S	
1985	SL	RU	27	F	Infirmier(e)	S	
1987	SL	Japon	48	M	Ingénieur(e)	S	
1987	SL, Libéria	Israël	47	M	Ingénieur(e)	S	
1989	Nigeria	Canada	38	M	Agriculteur	S	
1989	Nigeria	USA	43	M	Ingénieur	M	Décès J14
2000	BF, CI, Ghana	Allemagne	23	F	Touriste	M	Décès J15
2000	SL	RU	50	M	Bénévole	M	Décès J30
2000	Nigeria	Allemagne	57	M		M	Décès J16
2000	SL	Pays Bas	48	M	Médecin	M	Décès J16
2003	SL	RU	NS	M	Soldat	S	
2004	SL, Liberia	USA	38	M	Homme d'aff.	M	Décès J7
2006	SL	Allemagne	68	M	Touriste	S	
2007	Nigeria	Af. Sud	46	M	Médecin	S	
2009	Nigeria	RU	66	M	Retraité	M	Décès J23
2009	Mali	RU	24	M	NS	M	Décès J11
2010	Liberia	USA	47	H	NS	S	
2011	SL	Suède	30	F	Bénévole	S	
2014	Af. Ouest	USA	NS	NS	NS	O	
2015	Libéria	USA	NS	H	NS	M	Décès J8
2016	Togo	Allemagne	NS	H	Bénévole	M	
2016	Liberia	Suède	73	F	Retraîtée	S	

Tableau 3 : Cas de FL exportées en dehors des zones endémiques. D'après ^[44,55]. Etats Unis (USA), Sierra Leone (SL), Burkina Faso (BF), Côte d'Ivoire (CI), Royaume Uni (RU), Non signalé (NS), Féminin (F), Masculin (M), Survie (S), Mort (M).

II.3. Réservoir hôte et transmission

II.3.a. Chez le réservoir

Le principal réservoir du LASV est le rat du Natal (ou souris multimammaire) *Mastomys natalensis*. D'autres rongeurs (*Mastomys erythroleucus* et *Hylomiscus pamfi*) ont été récemment identifiés mais leur contribution dans la transmission du virus est encore inconnue ^[58]. *Mastomys natalensis* est l'un des rongeurs les plus répandus en Afrique sub-saharienne. Il est ubiquitaire et très prolifique, avec une période de gestation de 23 jours ^[59]. Sa répartition géographique est d'ailleurs un indicateur de risque pour la FL ^[60]. Ils sont majoritairement péri-domestiques en régions rurales et sont présents près des habitations et des provisions de nourriture (autour des agricultures et des jardins). Bien que les *Mastomys* soient nocturnes, les maisons de pisé, sombres et sans électricité, fréquentes dans les villages africains, peuvent permettre une activité diurne du rongeur. Par conséquent, la haute probabilité des contacts entre le réservoir et l'Homme dans ces régions entraîne des épidémies régulières de FL. Ceci est différent de beaucoup d'autres FHV comme la maladie à virus Ebola ou encore la fièvre jaune qui sévissent au cours d'épidémies sporadiques. La FL est une maladie plutôt rurale, très peu de cas étant issus des grandes zones urbaines ^[49]. Ceci peut être dû aux phénomènes de compétition avec d'autres rongeurs invasifs (*Rattus rattus* et *Mus musculus*) et à l'utilisation plus régulière de béton pour la construction des rues et des maisons dans les zones urbaines ^[61].

Les mécanismes de transmission du LASV chez le rongeur à l'état sauvage sont peu connus. Des études ont montré que la transmission verticale du virus, de l'adulte au nouveau-né, résultait en une infection persistante et asymptomatique. Les animaux expérimentalement infectés par LASV ou MORV (également isolé à partir du même réservoir) étaient virémiques et excrétaient du virus dans les selles et les urines ^[62]. Bien que cette étude apporte des pistes sur les possibilités de mécanismes de transmissions virales chez le rongeur, elle ne permet pas d'identifier de manière adéquate les modes de transmissions critiques et prédominants dans les conditions naturelles. Les données de terrain suggèrent que le principal mode de transmission chez les *Mastomys* est la transmission horizontale (entre individus de la même génération) ^[63]. A l'inverse de la transmission verticale, la transmission horizontale provoque chez le rongeur une courte infection immunisante avec une excrétion transitoire du virus. De manière plus générale, les évidences actuelles suggèrent que la plupart des transmissions du virus sont horizontales, mais que le faible taux de transmissions verticales (responsables d'infections chroniques) contribuerait à la persistance du virus dans la population ^[64-62].

Les raisons de cette adaptation entre le virus et son réservoir ne sont pas toutes connues. En zone d'endémie, cette adaptation est liée à la fréquence des contacts entre rongeurs et donc à leur densité. Par exemple, les facteurs anthropogéniques, provoquant le surpeuplement humain (pour raisons économiques ou politiques), et le mauvais stockage de la nourriture entraînent une surpopulation du rongeur pouvant déclencher des situations à haut risque infectieux [65]. La dynamique de population du *M. natalensis* est également liée à la persistance du virus dans l'environnement. Cette dynamique est liée à l'alternance des saisons sèches et humides. Bien que le rongeur soit capable de se reproduire toute l'année, la saison des pluies est associée à une meilleure fécondité, probablement en raison de la maturation des cultures et une disponibilité alimentaire par conséquent accrue. Les populations de rongeurs et leurs mouvements (rencontre mâles-femelles, stockage de la nourriture) sont donc plus importants à cette saison et ceci peut être corrélé avec un risque accru de contracter une FL [66].

En Afrique de l'Ouest, la prévalence du LASV chez *Mastomys natalensis* est comprise entre 5 et 20%, mais peut atteindre 80% dans certains villages [67]. L'écologie du LASV est encore mal comprise dans son ensemble et elle a été complexifiée par la découverte de deux nouveaux réservoirs hôtes, *Mastomys erythroleucus* et *Hylomiscus pamfi* [58]. Des *Mastomys erythroleucus* séropositifs au LASV ont été capturés dans des régions où *Mastomys natalensis* était absent mais où une séropositivité a été documentée chez l'Homme, suggérant une potentielle implication de cette nouvelle espèce dans la transmission zoonotique. Ceci souligne l'importance de mieux déterminer les réservoirs et les hôtes transitoires du LASV afin d'identifier les causes de la persistance du virus dans la nature et de prévenir les futures épidémies.

II.3.b. Chez l'Homme

Peu de choses sont connues sur la transmission du rongeur à l'Homme. De manière présumée, l'humain s'infecte par contact direct ou indirect avec les excréments, l'urine, le sang ou les tissus du rongeur infecté. Aucune différence épidémiologique n'a pour lors été reporté en fonction du sexe de l'individu, mis à part le cas des femmes enceintes, discuté en section IV.1.b. La plupart des contacts se produisent probablement dans les maisons, les jardins et dans les champs où la densité des rongeurs est la plus importante. La transmission la plus fréquente se fait par voie cutanéomuqueuse via la nourriture contaminée ou encore par les voies respiratoires via l'inhalation de particules aérosolisées provenant de l'urine séchée ou des fèces contaminées [51]. L'urine présente un risque particulièrement élevé d'infection pour

l'Homme. En effet *Mastomys natalensis* peut excréter du virus infectieux contenu dans l'urine quel que soit son âge et il a été montré en laboratoire que le LASV pouvait être aérosolisé [68]. La chasse et la consommation directe de rongeur sont également associées à un risque accru d'infection [69]. Enfin, les facteurs sociaux sont eux aussi associés au risque d'infection, notamment la qualité des habitations, la présence de terriers dans les maisons et la forte densité humaine présente à l'intérieur [70].

La transmission interhumaine s'effectue par contact avec les fluides infectés et cela s'observe principalement dans un contexte nosocomial [71]. En effet, le virus peut être excrété dans l'urine pendant 3 à 9 semaines après le déclenchement de la maladie. Le LASV peut également être transmis de manière sexuelle. Cependant, des recherches ont montré que la majorité des cas de FL était la conséquence de contacts avec le rongeur et non avec l'Homme. En effet, des modélisations épidémiologiques montrent que 20% des cas hospitalisés étaient attribuables à une transmission interhumaine [72].

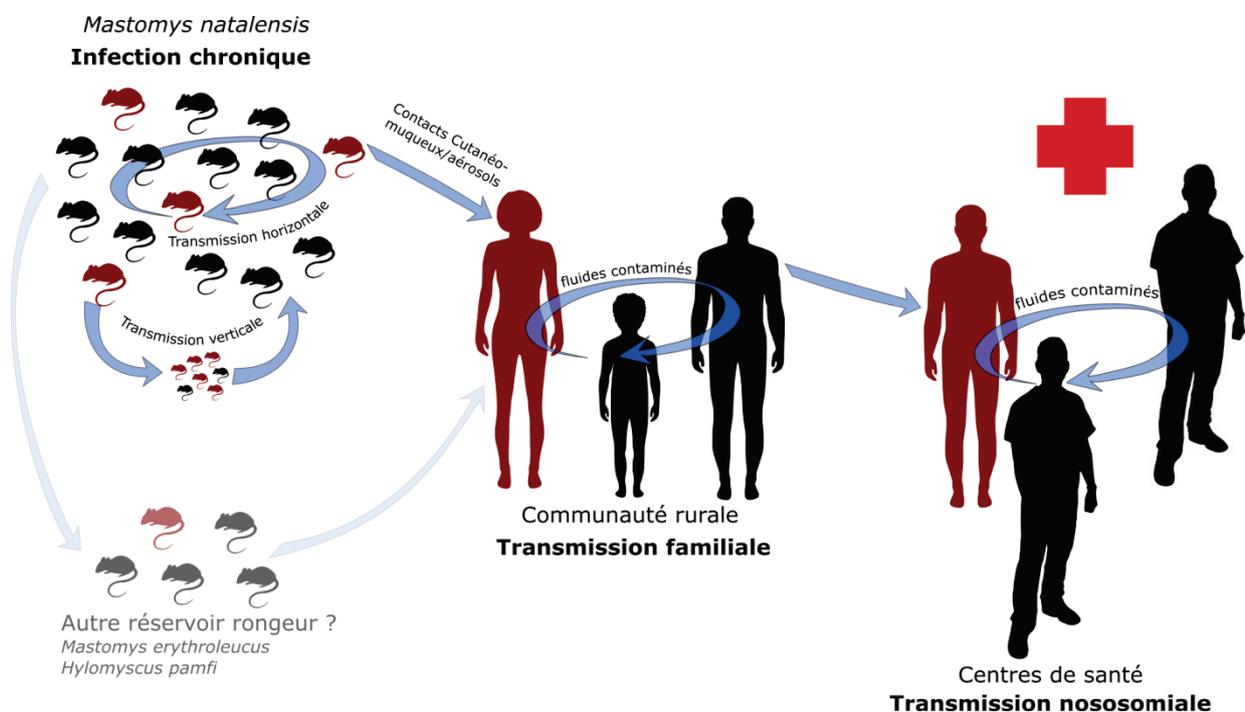


Figure 5 : Transmission du LASV chez le réservoir et du réservoir à l'Homme.

II.3.c. Distribution du LASV et de son réservoir

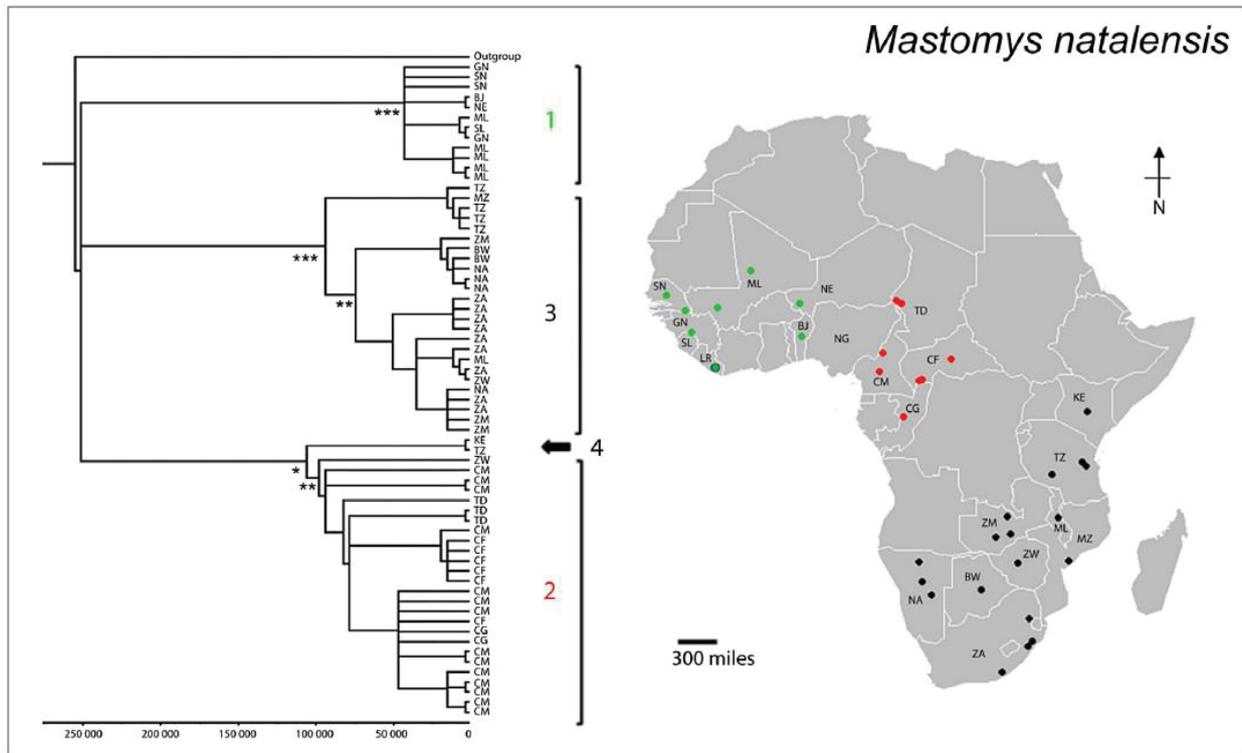


Figure 6 : Phylogéographie de *Mastomys natalensis*. Issu de [54]. Arbre phylogénétique de *M. natalensis* basé sur la séquence du cytochrome b. L'échantillonnage des rongeurs est représenté sur la carte et s'étend sur toutes les espèces présentes en Afrique subsaharienne.

Bien que la zone de répartition du *Mastomys natalensis* s'étende sur toute l'Afrique subsaharienne, comment expliquer que les cas de FL confirmés en laboratoire aient été identifiés uniquement en Afrique de l'Ouest ? Des études phylogéographiques suggèrent que les *Mastomys* d'Afrique de l'Ouest forment un clade distinct des autres rongeurs retrouvés dans le reste du continent. Le LASV aurait ainsi co-évolué uniquement avec ce clade (Cf. **figure 6**) [73]. Nous ignorons aujourd'hui si cette distribution limitée du LASV est due à des facteurs biologiques (résistance à l'infection retrouvée uniquement chez certains clades de *Mastomys*, phénomènes de co-infection avec d'autres Arénavirus) ou à des barrières géographiques empêchant la dispersion territoriale au sein d'un même clade de rongeur (notamment le désert du Sahara au nord et la chaîne de montagne camerounaise à l'est). Nous ignorons en particulier s'il existe des variations génétiques parmi les différentes populations de rongeurs favorisant les interactions hôtes pathogènes et comment celles-ci peuvent affecter géographiquement la distribution de la FL. Une étude récente en Tanzanie s'est intéressée à l'échantillonnage et à la caractérisation génétique de deux différents clades de *Mastomys natalensis* dans une zone géographique où ces clades sont en contact. Ils ont trouvé deux virus hébergés par les rongeurs : Gai-

ro et Morogoro, chacun spatialement confiné à un clade de *Mastomys*, pourtant localisé dans la même zone géographique. Leurs résultats montrent que chacun des deux virus a la capacité écologique de passer d'un clade à l'autre, mais le phénomène ne se produit pas. Cela suggère l'existence de distinctions génétiques intraspécifiques parmi les différents clades de *Mastomys natalensis*, pouvant être responsable de la restriction stricte du LASV au clade des rongeurs d'Afrique de l'Ouest ^[74]. Les études phylogéographiques sont importantes pour comprendre le rôle des résistances et des coinfections sur la distribution spatiale de la FL et pour déterminer si une expansion plus lointaine du virus dans l'Afrique subsaharienne est possible.

III. Structure et réplication du virus Lassa

III.1. Phylogénie et variabilité du virus Lassa

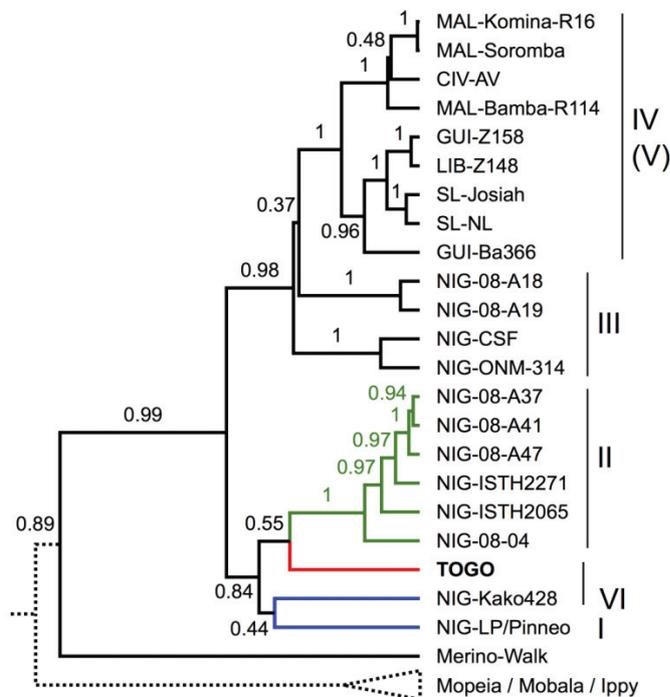


Figure 7 : Arbre phylogénétique montrant les relations entre les différentes souches de LASV. Issu de [75]. L'arbre phylogénétique a été enraciné en utilisant BEAST2 afin de comparer les séquences complètes de la protéine de matrice Z. Les analyses comprennent les souches du LASV ainsi que d'autres Arénavirus de l'ancien monde. Les différents lignages du LASV sont indiqués par des chiffres romains. La branche rouge correspond à la souche du Togo ; les branches vertes au lignage II, les branches bleues aux lignages I et VI. CIV : Côte d'Ivoire ; GUI : Guinée ; LIB : Libéria ; MAL : Mali ; NIG : Nigéria ; SL : Sierra Leone.

Différentes souches de LASV ont été isolées à partir du sang des patients ou des rongeurs au cours des différentes épidémies. Les différents isolats présentent des différences d'ordre génétique, sérologique et possiblement pathogénique. La première évidence de variabilité de LASV est le faible taux de neutralisation croisée observé au cours d'études sérologiques entre les différents isolats provenant d'une origine géographique différente [76]. Basé sur leur variabilité génétique, les différents isolats provenant de Guinée, Sierra Leone, Nigéria et du Liberia ont été regroupés en 6 lignages phylogénétiques. Les 3 premiers lignages proviennent du Nigéria [77]. Le lignage 4 provient de la zone comprenant la Côte d'Ivoire, le Mali, le Libéria, la Guinée et le Sierra Leone et contient la souche LASV-AV, utilisée au cours de cette étude et

isolée à partir d'un cas fatal importé (Cf. section II.2.b ^[46]). Le cinquième lignage provient de la région comprenant la Sierra Leone, le Liberia et la Guinée et comprend la souche LASV-Josiah, également utilisée au cours de cette étude et qui demeure la souche prototype de LASV, utilisée dans la plupart des études (C.f. **Figure 7**). Une souche récemment découverte au Nigéria, la souche Kako, diffère des autres et représente le lignage 6 ^[75]. L'ordre des branchements des lignages dans l'arbre phylogénétique indique que le virus a évolué de la même manière qu'il s'est répandu, de l'est (Nigeria) vers l'Ouest (Guinée). La variabilité au sein des lignages du LASV est élevée ^[78]. Les plus grandes différences sont observées sur les gènes L et Z, avec une différence moyenne de 26% en termes de nucléotides et 20% en termes d'acides aminés. Les gènes de structure NP et GPC sont plus conservés, avec une différence moyenne en nucléotides de 20% et 8% au niveau de la séquence en acides aminés. Par ailleurs, il est important de noter que la souche AV est phylogénétiquement proche de la souche Josiah.

III.2. Structure du virus Lassa

III.2.a. Structure du virion

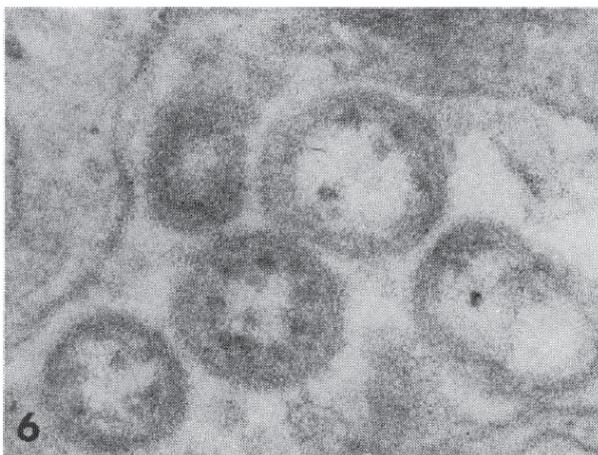


Figure 8 : Morphologie du LASV. Issu de ^[79]. Photographie obtenue à partir de sections ultra-fines de foie humain infecté par LASV. Observé sur un microscope électronique à transmission. Grossissement x129 000.

La structure du LASV a la même morphologie typique que les autres Arénavirus. Celle-ci est caractérisée par des particules de forme ronde, ovale ou pléomorphe d'un diamètre approximatif allant de 110 à 130 nm et qui consiste en une nucléocapside entourée d'une enveloppe lipidique ^[1]. Sur les photographies de microscopie électronique à balayage (C.f. **Figure 8**), l'intérieur du virion possède des structures à apparence granulaire due à l'incorporation des ribosomes de la cellule hôte au cours des phases d'assemblage viral. Ce phénomène, toujours inexpliqué aujourd'hui, a été la base pour l'élaboration du nom de la famille *Arenaviridae*. Cette incorporation des ribosomes dans la particule semble être un événement aléatoire dépendant des facteurs viraux et de la cellule hôte mais son rôle dans la ré-

plication des particules infectieuses n'a pas encore été découvert ^[80]. Les glycoprotéines GP1 et GP2 forment des projections et sont ancrées à la surface de l'enveloppe du virion. Ces glycoprotéines de surface sont alignées avec la protéine de matrice Z sous-jacente et le complexe ribonucléoprotéique (RNP), empaqueté à l'intérieur d'une couche bidimensionnelle au niveau interne de la membrane virale.

III.2.b. Organisation du génome

Le génome des Arénavirus consiste en deux segments d'ARN monocaténaux de polarité négative, le segment L (Large) de 7200 nucléotides et S (Small) de 3400 nucléotides (C.f. **Figure 9.B**). Chacun de ces deux segments utilise une stratégie de répllication ambisens et code pour deux gènes avec une orientation opposée, séparés par une région intergénique non codante en épingle à cheveux. Le segment L code pour l'ARN polymérase ARN dépendante (L) et la protéine de matrice en doigt de zinc (Z). Le segment S code pour le précurseur de la glycoprotéine de surface (GPC) et pour la nucléoprotéine (NP). La GPC subit ensuite un clivage post-traductionnel, formant les deux glycoprotéines GP1 et GP2 associées avec le peptide signal stable (SSP). La structure du virion est expliquée ci-dessous (C.f. **Figure 9.A**). Chaque segment viral est encapsidé par la NP. Avec la polymérase L, ils forment le complexe RNP. Ce dernier est recouvert par l'enveloppe virale, dérivée de la membrane plasmique de l'hôte au cours des étapes de bourgeonnement viral. Cette enveloppe virale est recouverte par la protéine de matrice Z sur sa paroi interne et par les glycoprotéines matures qui forment des homotrimères sur sa paroi externe ^[81]. L'ARN présent à l'intérieur du virion est celui défini comme étant l'ARN génomique. Néanmoins, de plus petites quantités d'ARN antigénomique peuvent parfois être empaquetées dans le virion ainsi que des ARN ribosomaux, sans que leur rôle n'ait été clairement défini ^[82,83].

Le LASV a la particularité de posséder 19 nucléotides situés à chaque extrémité 5' et 3' des brins L et S. Ces séquences non codantes sont complémentaires entre elles et sont fortement conservées parmi les Arénavirus. Cette complémentarité suggère la formation d'un manche thermodynamiquement stable requis pour la fixation de la polymérase virale ^[84]. Cette région promotrice est composée de deux éléments fonctionnels. La première région, composée des nucléotides 1 à 12, interagit avec le complexe de répllication et la seconde région, composée des nucléotides 13 à 19 est importante pour la répllication et la transcription virale ^[85]. Enfin, la région intergénique en épingle à cheveux, présente sur chaque segment viral, apparaît comme structurellement importante pour la régulation de la terminaison de la transcription ^[86].

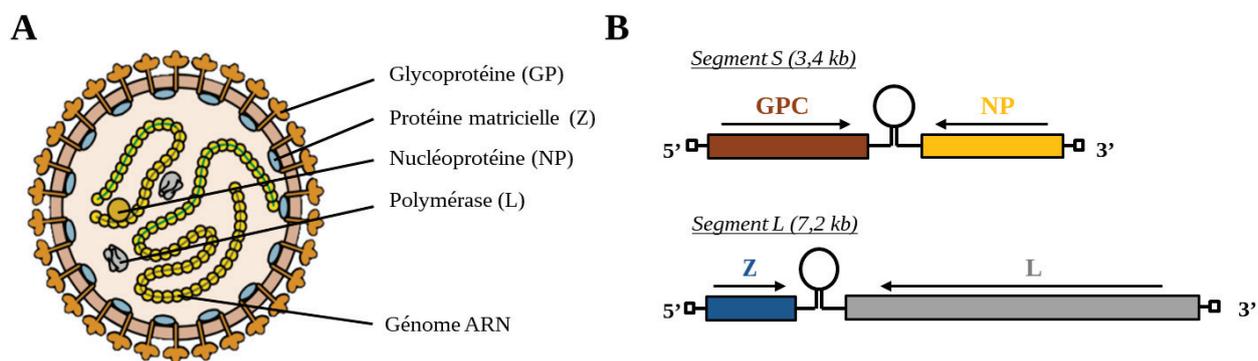


Figure 9 : Organisation du virion et du génome des Arénavirus. (A) Représentation schématique d'une particule du LASV. (B) Génome ambisens du LASV. Les carrés à chaque extrémité représentent les régions promotrices du virus.

III.3. Rôle des protéines virales

Le génome des Arénavirus encode pour seulement 4 protéines : L, Z, NP et GPC. Un si petit nombre de protéines implique que chacune d'entre elles joue plusieurs rôles, notamment structuraux et régulateurs.

III.3.a. La nucléoprotéine NP

La nucléoprotéine NP est la protéine la plus abondante composant le virion (1500 molécules par virion ^[87]) et à l'intérieur des cellules infectées. Cette protéine composée de 569 acides aminés et d'un poids moléculaire de 63 kDa a de multiples fonctions biologiques au cours de l'infection. Sa fonction structurale principale est l'encapsidation du génome viral, ce qui forme avec la polymérase L le complexe RNP, soit l'unité infectieuse minimale des Arénavirus ^[88]. Des études cristallographiques ont identifié deux domaines distincts, N et C-terminaux, au sein de la NP de LASV et MOPV ^[89]. Des propriétés similaires ont été trouvées ensuite pour les Arénavirus du nouveau monde, notamment les virus Junin et Tacaribe ^[90,91]. Ces études proposent des hypothèses modélistes expliquant l'origine du complexe RNP ^[92]. Elles montrent *in vitro* que la NP s'associe en homotrimères orientés tête bêche, formant une structure en anneau et représentant une forme fermée de la structure dans laquelle l'ARN ne peut se lier dans la cavité centrale (C.f. **Figure 10.A, B**). Le domaine C-terminal de la NP doit alors subir un changement conformationnel, notamment un décalage, afin de permettre la liaison de la protéine à l'ARN. Ce décalage pourrait se produire suite à la liaison de la NP avec

un cofacteur, notamment la polymérase ou le génome viral (C.f. **Figure 10.C**). La liaison de l'ARN à la structure entrainerait un changement conformationnel des trimères de NP vers des monomères de NP alignés le long de l'ARN viral (C.f. **Figure 10.D**). Chaque domaine N-terminal de la NP interagirait avec le domaine C-terminal de la NP voisine. Le domaine N-terminal de la NP contient également une cavité lui permettant de se lier à la coiffe des ARNm viraux et de les protéger ^[93]. Ce mécanisme serait utilisé lors du phénomène de vol de coiffe des ARNm cellulaires, fonction réalisée par le domaine N-terminal de la polymérase et nécessaire à la production d'ARNm viraux ^[94].

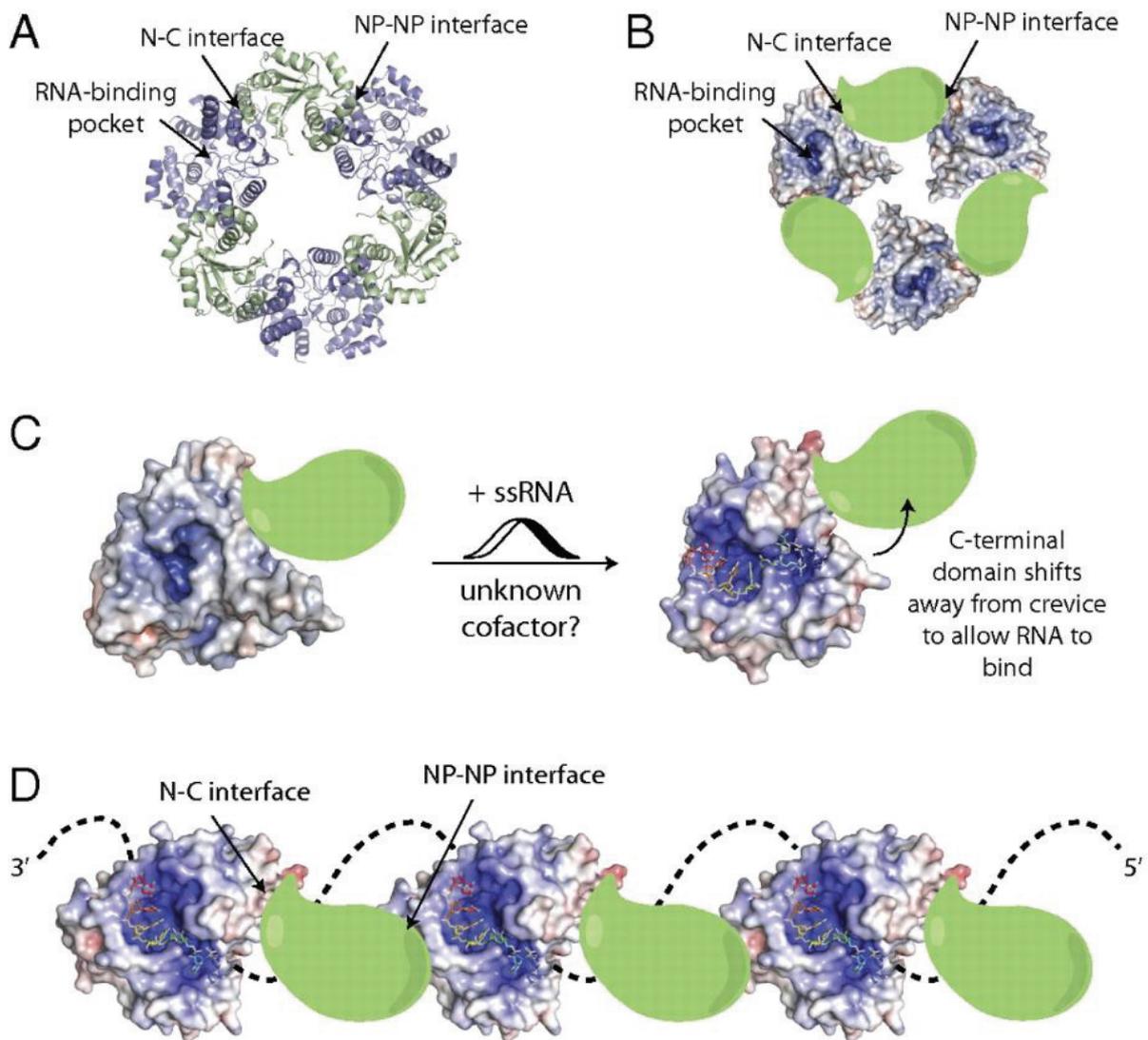


Figure 10 : Un modèle d'organisation de la NP et du complexe RNP des Arénavirus. Issu de ^[92]. A, Organisation du trimère de NP sans liaison à l'ARN. B, Modélisation de la structure en anneau, fermée, du trimère de NP. C, Ouverture du trimère de NP après fixation d'un cofacteur inconnu ou de l'ARN viral. D, changement conformationnel du trimère de NP vers une structure de monomères de NP alignés.

Outre ses activités structurales clés, la NP joue également un rôle régulateur de la réponse immunitaire innée. En effet, le domaine C-terminal de la NP a une conformation très proche de celle de la famille des exoribonucléases DEDDh ^[95]. De plus les résidus D389, E391, D466, D533 et H528 sont conservés parmi toutes les NP des Arénavirus et localisés à des positions identiques, mettant en évidence que la NP est un membre de la familles des exonucléases DEDDh ^[93]. Au cours de l'infection virale, la réplication des virus à ARN monocaténaire peut générer de courts intermédiaires ARN double brins. Ces intermédiaires constituent des PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) qui sont reconnus par les PRR (Pattern Recognition Receptors) cellulaires, notamment RIG-I et MDA5. Ces derniers initient ensuite une cascade de signaux aboutissant à la synthèse d'interféron de type I (IFN-I) et l'induction de la réponse antivirale. L'activité exonucléasique de la NP du LASV, et principalement les résidus D389 et G392, est capable de digérer l'ARN double brin généré par la réplication virale, empêchant la reconnaissance de l'ARN viral et l'induction de la production d'IFN-I ^[96-98]. La création d'un LASV mutant dans lequel la fonction exonucléasique est abolie suffit à amplifier la réponse immunitaire dans les cellules dendritiques (DC) et macrophages infectés, montrant le rôle clé joué par l'activité exonucléasique de la NP dans l'évasion du système immunitaire ^[99]. La NP de LASV et LCMV peut également empêcher l'établissement d'une réponse antivirale en bloquant la translocation nucléaire d'IRF-3 et donc la transcription des IFN α/β . D'autres études ont montré que la NP pouvait se lier au facteur IKK- ϵ et le séquestrer dans une forme inactive, empêchant la phosphorylation et la translocation nucléaire d'IRF-3 ^[97,98,100].

Enfin, le domaine N-terminal de la NP est également régulateur des étapes de bourgeonnement via son association avec la protéine de matrice Z. Ceci a été montré pour les virus Junin, Tacaribe et Mopeia et semble être important pour l'incorporation du complexe RNP dans les particules infectieuses ^[101-103].

III.3.b. La polymérase L

Le segment L du virus Lassa code pour l'ARN polymérase ARN dépendante L. Cette polymérase de 250 kDa et longue de 2218 acides aminés diverge de 18% dans sa séquence en acide aminé parmi les L des différentes souches de LASV ^[104]. Celle-ci présente des motifs conservés caractéristiques des polymérases des virus à ARN négatif. La L, composée de 3 régions, est requise pour la réplication et la transcription, via son domaine central allant des acides aminés 1000 à 1500 (C.f. **Figure 11**). Des études de mutagénèse ont montré que 3 résidus

situés dans la région centrale étaient particulièrement importants pour la transcription, mais pas pour la réplication. Il s'agit des résidus Asp-89, Glu-102 et Asp-119 [94]. La L permet la synthèse de deux espèces d'ARN : les ARNm viraux se terminant dans la région intergénique, et les ARN viraux génomiques et antigénomiques, représentant une copie complète du génome. Les ARNm viraux contiennent à leur extrémité 5' une coiffe et ne sont pas polyadénylés [86]. Il est proposé que cette coiffe est clivée de l'extrémité 5' des ARNm cellulaires par une endonucléase, servant ensuite d'amorce pour la synthèse des ARNm viraux, un mécanisme appelé « vol de coiffe ». Ce mécanisme a été à l'origine décrit pour le virus Influenza, qui partage les mêmes particularités de réplication que les Arénavirus [105]. Les Arénavirus utilisent cette stratégie via l'activité endonucléase de la région N-terminal de la polymérase [106]. Cette région N-terminal est également importante pour la transcription mais pas pour la réplication virale [94]. La région C terminale de la polymérase serait impliquée dans la transcription et potentiellement dans la liaison à la coiffe des ARNm cellulaires [107]. Enfin, la L peut également former des complexes avec la protéine de matrice Z via des interactions directes, inactivant la L et régulant ainsi la réplication et la transcription de l'ARN. Cette inhibition de la Z n'empêche pas le recrutement de la L au niveau du promoteur génomique et l'interaction Z-L serait donc une étape clé assurant l'assemblage de l'ARN génomique avec la L dans les virions nouvellement synthétisés [108].

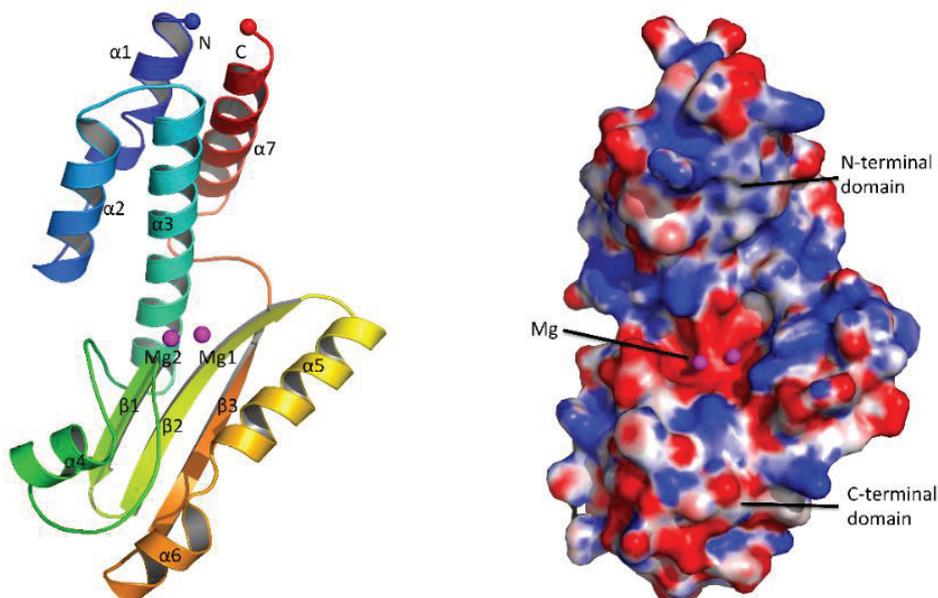


Figure 11 : Structure de la polymérase L du LASV. Issu de [109]. A gauche se trouve une représentation structurale de la L. Le domaine N-terminal est présenté en bleu, le domaine C-terminal en rouge et le domaine endonucléase central en cyan-vert-jaune-orange. A droite sont représentées les charges électrostatiques de la L ; les résidus en bleu sont positivement chargés et les résidus en rouge sont négativement chargés.

III.3.c. Les glycoprotéines GP1 et GP2

Le segment S code pour un précurseur polypeptidique (GPC). Cette polyprotéine de 76 kDa subit un clivage en deux étapes pour donner les glycoprotéines matures GP1 et GP2 ainsi que le peptide stable SSP. La première étape de clivage implique un adressage de la polyprotéine GPC dans la membrane du réticulum endoplasmique via la myristoylation du peptide SSP. Dans le réticulum, GPC est clivé par des peptidases (SPase) cellulaires, séparant le peptide SSP de la GP immature (C.f. **Figure 12**)^[110]. Contrairement à la plupart des virus, le SSP est long (58 acides aminés pour LASV et LCMV tandis que les autres peptides signal sont longs de 15 à 25 acides aminés) et n'est pas dégradé. Ce dernier est retenu avec le précurseur GP1/2 immature^[111]. De plus, le SSP de MOPV et LASV présente une longue demi vie et est résistant à la dégradation par les protéases, contrairement aux autres peptides signal, suggérant un rôle supplémentaire du peptide dans le cycle viral outre son rôle de translocation de la GPC dans le réticulum endoplasmique^[112]. La seconde étape de clivage de la GP1/2 de LASV a lieu à la frontière entre le réticulum endoplasmique et la région *cis*-Golgi, alors que celle de LCMV est clivée au niveau du *trans*-Golgi^[113,114]. La GP1/2 immature est clivée de manière post-traductionnelle en GP1 (44 kDa) et GP2 (36 kDa). Ce clivage se situe après la séquence RRLL, séquence consensus et conservée parmi les Arénavirus. La subtilase SKI-1/S1P, à l'origine impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique, a été identifiée comme nécessaire à ce clivage. De plus, il a été montré que le SSP pouvait également assurer un repliement correct de la protéine GP1/2 pour un clivage efficace par SKI-1/S1P^[110,115]. En l'absence du clivage de la GPC, des particules non infectieuses enveloppées contenant le complexe RNP, la Z, mais pas de glycoprotéines, sont relâchées des cellules infectées^[113]. Le clivage de la GPC est donc nécessaire à la production de particules virales infectieuses.

Les glycoprotéines matures sont ensuite dirigées vers la membrane plasmique où les étapes finales de bourgeonnement ont lieu. A la surface du virion, les glycoprotéines GP1 et GP2 s'assemblent pour former des homotétramères reliés de manière non covalente (C.f. **Figure 12**)^[116]. GP1 est la protéine distale extramembranaire, responsable de la reconnaissance et de la fixation au récepteur présent à la surface des cellules, l'alpha dystroglycane (α -DG)^[117]. La protéine GP2 est une protéine de fusion de classe I qui régule la fusion de l'enveloppe virale avec celle de la membrane plasmique, c'est-à-dire l'entrée du virus dans la cellule hôte. Le domaine SSP, toujours présent dans le trimère de glycoprotéines, joue des rôles essentiels dans la biosynthèse, le clivage et la maturation du GPC ainsi que dans les étapes de fusion. En effet la lysine en position 33 du peptide participerait au maintien de la GPC en état de pré-

fusion à pH neutre et à la déstabilisation de ce même complexe à faible pH (pH<5), permettant la cascade d'étapes amenant à la fusion [118]. Le mécanisme d'interaction des trois sous unités reste complexe et n'est pas encore parfaitement connu.

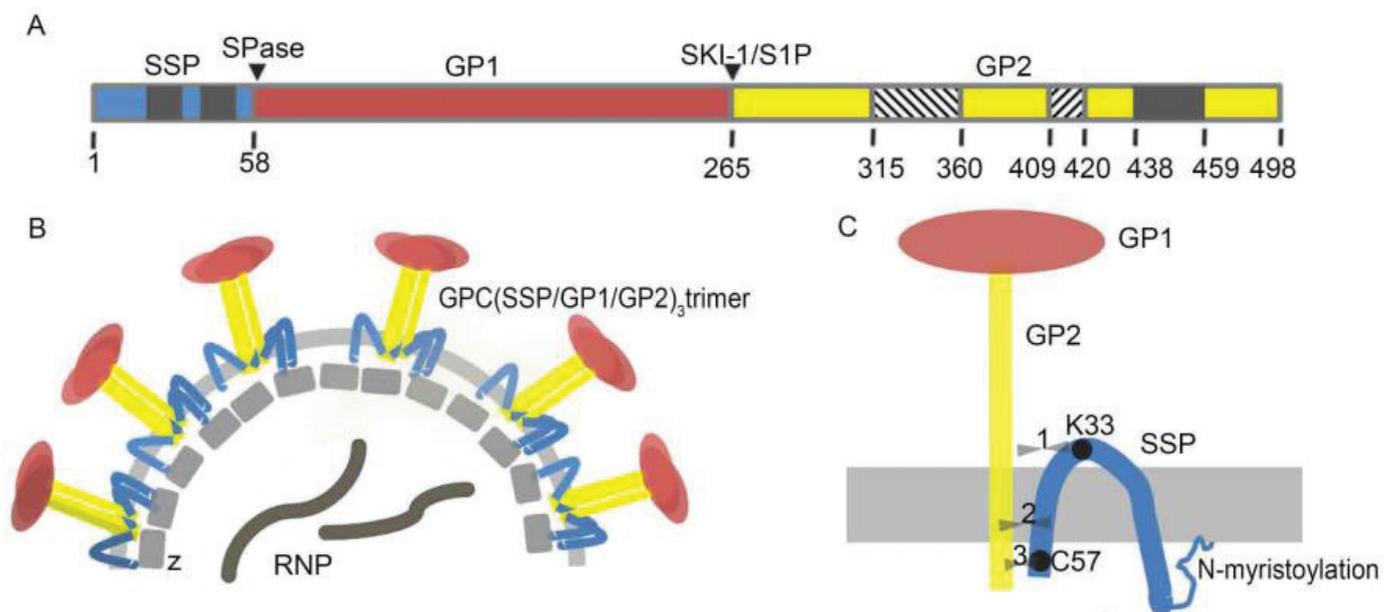


Figure 12 : Représentation schématique de la GPC et des sous-unités GP1, GP2 et SSP. Issu de [119]. A, Représentation du cadre ouvert de lecture de la GPC avec les sites de clivage des SPase et de SKI-1/S1P. Les domaines transmembranaires à l'intérieur des unités SSP et GP2 sont montrés en gris. B, Schéma d'un virion avec la GPC tripartite, la Z et le complexe RNP. C, Schéma détaillé des trois sous unités de la GPC. Les trois flèches opposées représentent les potentiels sites d'interaction entre SSP et GP2.

III.3.d. La protéine de matrice Z

La protéine de matrice Z des Arénavirus est une petite protéine structurale de 11 kDa avec de multiples fonctions au cours du cycle viral. Elle possède un domaine central RING d'environ 60 résidus contenant des résidus cystéine et histidine conservés capable de se lier au zinc. Ce domaine agit comme une plateforme permettant l'interaction de Z avec les différents partenaires viraux et cellulaires. Elle possède un site de myristoylation dans son domaine N-terminal, nécessaire pour la stabilité conformationnelle et l'assemblage de complexes protéiques à la surface de la membrane plasmique. Enfin, le domaine C-terminal de LASV contient deux domaines tardifs PTAP et PPPY, retrouvés sur de nombreuses protéines de matrice de virus à ARN [120]. Ces domaines tardifs, très conservés parmi les Arénavirus, sont impliqués dans l'interaction des protéines virales avec les composants de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) et sont donc importants pour le bour-

geonnement viral. Les différents domaines de la Z sont schématisés dans le schéma ci-dessous (C.f. **Figure 13**).

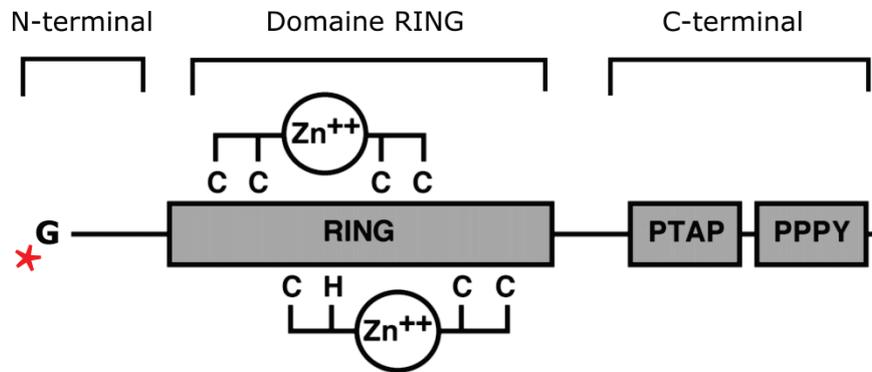


Figure 13 : Domaines structuraux et fonctionnels de la Z de LASV. L'étoile correspond au site de myristoylation. G, glycine ; C, cystéine ; H, histidine ; P, proline ; Y, tyrosine ; T, thréonine ; A, alanine.

La protéine Z des Arénavirus a un rôle critique dans l'assemblage viral en permettant l'incorporation de la GP, de la NP et de la polymérase L dans le virion. En effet, la myristoylation du domaine N-terminal de la Z est nécessaire pour l'interaction avec le peptide SSP de la GP. Cette association est déterminante pour le bourgeonnement de particules infectieuses du LASV mais également de pseudo-particules virales ^[121,122]. L'interaction du domaine central RING de la Z avec la NP est également une étape clé de l'assemblage viral au sein des Arénavirus ^[101,102,123-125]. Z a également un rôle central dans le bourgeonnement viral. En effet, il a été montré que la Z pouvait interagir avec plusieurs protéines cellulaires essentielles au bourgeonnement via ses domaines tardifs. Il s'agit des facteurs Tsg101, relié au complexe ESCRT, Vps4A, Vps4B et ALIX ^[36,126,127]. De plus, la protéine Z de LASV seule peut former des pseudo-particules qui sont libérées hors de la cellule, sans l'intervention d'autres protéines virales. Cette propriété dépend de son domaine RING ^[122]. En résumé, les différents domaines de la protéine Z lui permettent de jouer des rôles structuraux essentiels pour l'assemblage et le bourgeonnement viral.

Outre ses rôles structuraux, la Z régule également des fonctions clés de la cellule infectée via ses interactions directes avec différents partenaires, favorisant ainsi la réplication virale. Ces partenaires sont notamment la PML (promyelocytic leukemia protein), la protéine ribosomale P0, le facteur d'initiation à la traduction eucaryote eIF4E et la protéine PRH (proline-rich ho-

meodomain protein). La transfection transitoire de la protéine Z seule de LASV et LCMV a colocalisé avec la PML et a suffi à la relocalisation de la protéine cellulaire du noyau vers le cytoplasme ^[128]. La PML est impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme l'oncogenèse, la transcription, la traduction et les modifications post traductionnelles, la régulation du cycle cellulaire et également dans la réponse inflammatoire ^[129]. Des études ont montré que LCMV se répliquait davantage dans les cellules où la PML était absente. En revanche sa surexpression n'exerçait pas d'effets antiviraux additionnels contre LASV et LCMV, ce qui suggère que la PML agit en tant que médiateur de l'inflammation au cours de l'infection par ces virus ^[130,131]. D'autres études ont également montré que l'interaction de la Z de LCMV avec la protéine P0 pouvait jouer un rôle dans la réplication du virus. De plus, P0 était présent dans les virions tandis que la PML ne l'était pas, suggérant un rôle supplémentaire de P0 dans l'assemblage des Arénavirus ^[132]. La protéine Z de LASV et LCMV interagit également avec eIF4E, réduisant son affinité avec son substrat, la coiffe des ARNm, et réprimant ainsi la traduction cellulaire ^[133,134]. Enfin, la protéine Z possède des rôles régulateurs transcriptionnel via ses interactions avec la polymérase L. En effet, il a été montré que la Z pouvait interagir avec la polymérase au niveau du promoteur viral (extrémités 3' et 5' de chaque segments) et inactiver son activité catalytique, réprimant l'activité transcriptionnelle et limitant la réplication virale ^[108,135,136].

De plus, la protéine Z est impliquée dans le détournement de la réponse immunitaire innée. Il a été montré que la Z des Arénavirus du nouveau monde se liait à RIG-I, un senseur cellulaire de l'infection par des virus à ARN régulant la synthèse d'IFN-I, empêchant l'interaction avec MAVS et réduisant ainsi l'activation des facteurs NFκB et IRF-3 et la synthèse en aval d'IFN-I. Cette particularité n'a pas été observée pour les virus de l'ancien monde LASV et LCMV ^[137]. Cette étude est en contradiction avec une étude plus récente montrant que la Z des Arénavirus pathogènes se liait à RIG-I et MDA-5, supprimant la production en aval d'IFN-I dans des macrophages primaires. Ce phénomène n'a pas été observé au cours de l'infection par des Arénavirus non pathogènes ^[138]. Des travaux non publiés réalisés dans notre laboratoire ont mis au point un LASV chimérique arborant le gène de la Z d'un Arénavirus non pathogène, MOPV. L'infection de cellules dendritiques par le LASV sauvage ou par le LASV chimérique n'a pas activé les lymphocytes T *in vitro*, suggérant l'absence d'un rôle inhibiteur de la Z d'un Arénavirus non pathogène sur la réponse immunitaire innée. Ces résultats contredisent donc les travaux précédents.

III.4. Cycle viral

III.4.a. Récepteur et entrée virale

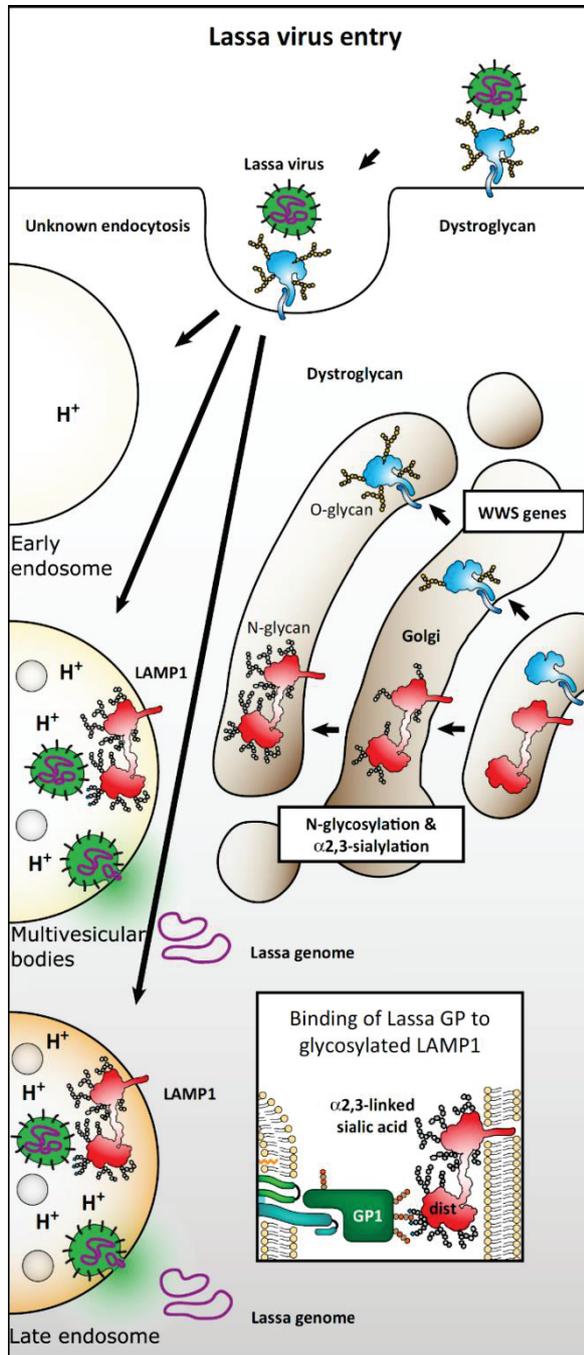


Figure 14 : L'entrée du LASV. Issu de L.T. Jae *et al.* LASV s'attache à l' α -DG O-glycosylée à la surface de la cellule. Le virus subit ensuite une macropinocytose contournant les endosomes précoces. L'acidification des corps multivésiculaires permet à LASV de se fixer à l'acide sialique α 2,3 du récepteur LAMP1. A la suite de la fixation, LASV fusionne avec la membrane des endosomes tardifs, libérant le génome viral dans le cytosol.

L'entrée virale représente la toute première étape de l'infection virale. Le type de récepteur utilisé est déterminant pour le tropisme viral. L'entrée virale est strictement dépendante de l'interaction entre la glycoprotéine virale et un récepteur situé au niveau de la membrane plasmique de la cellule hôte. Le premier récepteur du LASV à avoir été identifié est l' α -DG [117]. Cette protéine sert aussi de récepteur pour d'autres Arénavirus de l'ancien monde, notamment LCMV, MOPV et MOBV ainsi que pour le clade C des Arénavirus du nouveau monde [139]. Plus récemment, quatre autres protéines, TAM (AXL et Tyro3), ICAM-3, DC-SIGN et LSECtin, ont été identifiées comme nouveaux récepteurs potentiels du virus LASV [140]. Ces molécules permettraient la liaison du virus aux cellules et l'infection d'une manière indépendante à l' α -DG. Cette découverte est cependant spécifique d'un type cellulaire précis et en contradiction avec d'autres études [141,142]. Leurs rôles précis sont encore

inconnus. De manière intéressante, le clade B des Arénavirus, comprenant les espèces pathogéniques du nouveau monde, utilise le récepteur TfR1 (human transferrin receptor-1) pour infecter les

cellules cibles ^[143]. Les étapes d'entrée virale sont schématisées plus haut (C.f. **Figure 14**, issu de ^[144]). L' α -DG est présent dans la plupart des tissus chez les mammifères. Ce récepteur est également exprimé sur les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques et les macrophages, qui représentent les principales cibles du LASV *in vitro* ^[145,146]. L' α -DG est un récepteur glycoprotéique de 120 kDa très conservé chez les vertébrés et les invertébrés. Un seul gène encode pour une protéine précurseur du dystroglycane. Ce précurseur subit une protéolyse post traductionnelle le clivant en deux sous-unités α et β liées entre elles de manière non covalente. L' α -DG est présent à la surface de la membrane plasmique et interagit avec les protéines constituant la matrice extracellulaire. Le β -DG transmembranaire est associé au cytosquelette d'actine via son association avec la dystrophine et l'utrophine ^[147]. Par ailleurs, cette sous unité β n'est pas un cofacteur essentiel pour l'entrée des Arénavirus ^[148]. L' α -DG possède deux régions globulaires séparées par un domaine mucine riche en serine et thréonine. Ce domaine subit une glycosylation complexe de type O-mannosylation, effectuée par la glycosyl-transférase LARGE ^[149]. Cette modification glycosidique est importante pour l'entrée et le bourgeonnement des particules virales ^[150]. Tandis que l' α -DG est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus, sa glycosylation par LARGE, quant à elle, est tissu spécifique, indiquant que le dystroglycane peut agir en tant que récepteur régulateur ^[151]. La liaison de l' α -DG par la GP1 de LASV induit une phosphorylation du β -DG cytosolique, entraînant une dissociation du récepteur avec l'utrophine, promouvant probablement l'internalisation du complexe récepteur-virus à l'intérieur de la cellule hôte ^[152]. Les Arénavirus, y compris LASV, entrent dans la cellule hôte par un mécanisme d'endocytose dépendant du récepteur avec un transport ultérieur vers les endosomes tardifs, où la fusion se déroule à faible pH. Cette entrée du virus se fait par macropinocytose indépendante de clathrine, alvéoline et dynamine ^[153]. Elle serait néanmoins dépendante des échangeurs sodium-hydrogène, comme cela a été montré pour les virus LCMV et LASV ^[154,155]. La macropinocytose est une voie cellulaire couramment empruntée par les virus. Ces derniers sont capables de l'activer suite à l'attachement du virus à la membrane plasmique, induisant une dépolymérisation de l'actine et une absorption de la particule ^[156]. La macropinocytose du LASV est particulière car elle n'affecte que légèrement la membrane de la cellule hôte et la polymérisation de l'actine ^[155]. En revanche, plusieurs kinases impliquées dans la macropinocytose sont requises pour l'entrée du LASV, notamment PKC (protéine kinase C), PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase), EGFR (epithelial growth factor receptor) et HGFR (hepatocyte growth factor receptor) ^[155].

Une fois internalisé, le complexe récepteur-LASV est rapidement livré aux endosomes tardifs, passant à travers les corps multivésiculaires et détournant la machinerie ESCRT, notamment les composants Tsg101, Vps22, Vps24 et Vps4 qui jouent un rôle clé dans ce trafic ^[157]. Dans l'endosome tardif mature et acide, LASV se dissocie de l' α -DG et engage son second récepteur intracellulaire récemment identifié, LAMP1 (lysosome associated membrane protein 1) ^[158]. L'engagement de LAMP1 avec LASV, combiné à un pH faible (<5), induit un changement conformationnel de la protéine GPC où GP1 se dissocie du dystroglycane, conduisant GP2 dans un état actif qui s'insère dans la membrane de l'endosome créant un pore de fusion ^[159]. Cela déclenche la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome tardif. Par un mécanisme toujours inconnu aujourd'hui, le complexe RNP est libéré de la particule virale et entre dans le cytosol pour initier la transcription et la réplication.

III.4.b. Réplication et transcription

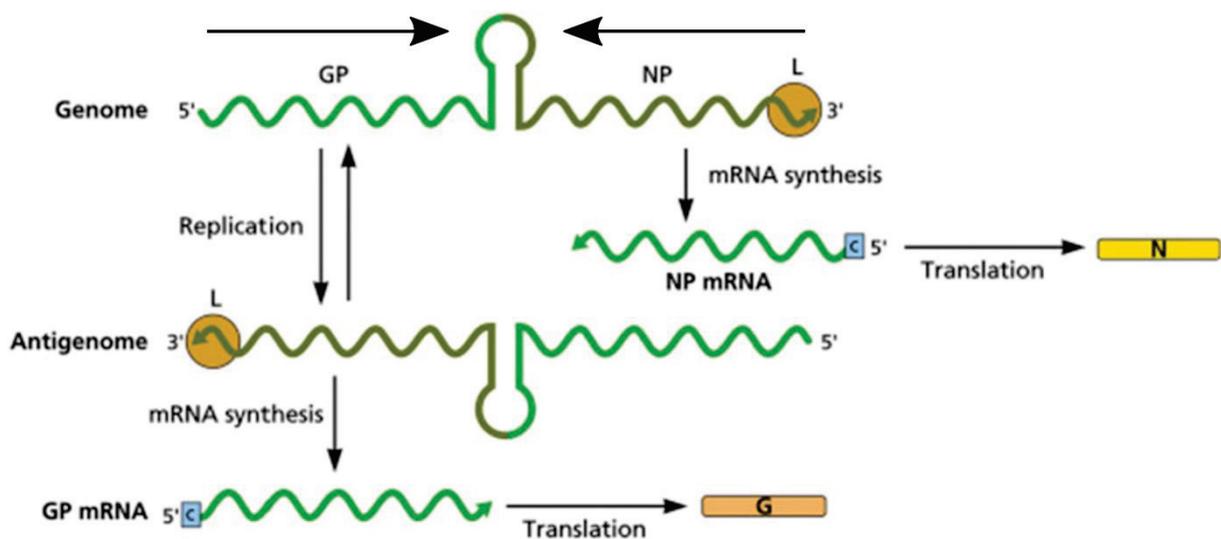


Figure 15 : Réplication du segment S du virus Lassa. issu de ^[160]. Par souci de simplicité, seul le segment S est représenté, mais la stratégie adoptée par le segment L est identique. La polymérase L (cercle orange) se fixe sur l'extrémité 3' de l'ARN et démarre la synthèse de l'ARNm (+) de la NP, directement traduit en protéine fonctionnelle. La L continue ensuite la lecture du brin S dans le sens 3'5' amenant à la formation d'un segment S antigénomique complet et complémentaire. La polymérase L se fixe ensuite à l'extrémité 3' du segment S antigénomique pour initier la synthèse de l'ARNm (+) de la GP et la synthèse de novo d'un segment génomique complet.

Une fois le matériel génomique libéré dans le cytosol, le virus se réplique de manière non cytotolytique. L'ARN viral seul n'est pas infectieux. La réplication et la transcription du gé-

nome requiert l'association de la polymérase, déjà présente dans le virion, avec le complexe RNP (C.f. **Figure 15**). Les complexes RNP peuvent synthétiser l'ARN viral *in vitro* et initier la réplication virale dans les cellules transfectées ^[161]. Pendant la réplication virale, une copie complète des segments génomiques S et L est synthétisée, aboutissant à la création des deux segments S et L en orientation opposée, dits antigénomiques. En raison de son génome ambisens, l'ARN génomique et antigénomique servent tous les deux de modèle pour la transcription des ARNm viraux. Les transcrits de chaque gène contiennent une coiffe mais ne sont pas polyadénylés. Ils se terminent pour chacun d'entre eux dans la région intergénique au niveau de la boucle en épingle à cheveux, suggérant un rôle important de cette structure dans la terminaison de la transcription. Cependant, ces transcrits peuvent être créés même en l'absence de ces structures dans un contexte artificiel ^[161,162]. Les premiers transcrits à être synthétisés sont les ARNm NP et L, représentant les facteurs minimums requis pour la synthèse d'ARN ^[162,163]. Ensuite, la polymérase adopte un mode réplacase et se déplace de la région intergénique pour générer le brin complémentaire antigénomique des brins S et L. Ces ARN antigénomiques servent de modèle pour la synthèse en ARNm des gènes viraux en orientation génomique GPC et Z. Comme lors de la transcription du brin génomique, la polymérase, au niveau de la région intergénique, continue la lecture du brin antigénomique pour créer les brins complémentaire génomiques S et L.

III.4.c. Assemblage

A la suite des cycles de transcription et de réplication et afin de produire des particules virales viables et infectieuses, le virus doit recruter le complexe RNP aux endroits spécifiques de la membrane plasmique où les glycoprotéines matures sont ancrées, avant la sortie des virions. Ces étapes constituent l'assemblage virale et nécessitent des processus d'interactions organisés et coordonnés. La protéine Z est centrale dans ces étapes puisqu'elle permet l'incorporation de toutes les protéines virales, NP, GPC, L ainsi que le génome ARN dans la membrane des particules naissantes.

Le mécanisme par lequel la GPC est incorporée dans la membrane des virions pendant l'assemblage du LASV n'est que partiellement décrit. Toutefois, la myristoylation du domaine N-terminal de la Z interagit avec la sous-unité SSP du GPC ^[164] (C.f. **Figure 16**). L'association de la Z et de la GP détermine le relargage des particules virales dans les cellules épithéliales polarisées, où l'expression de la Z seule induit un bourgeonnement des pseudo-particules au niveau de la membrane apicale et basolatérale tandis que l'ajout de la GP modi-

fie la trajectoire des pseudo-particules, qui ne bourgeonnent plus qu'à la membrane apicale [122]. De plus, Z et GP colocalisent dans le cytoplasme des cellules, proche du noyau.

La Z est également capable de lier directement et de recruter la NP, et peut être le génome viral, au niveau de la membrane plasmique [165] (C.f. **Figure 16**). Cette collaboration intracellulaire entre les deux protéines conduit à l'incorporation de la NP dans les pseudo-particules de LASV induites par la Z [122]. Des résultats similaires ont été décrits pour d'autres Arénavirus du nouveau monde (TCRV, JUNV) et de l'ancien monde (LCMV, MOPV) [101,123–125], suggérant que cette interaction est conservée au sein de cette famille virale. L'interaction nécessite le domaine RING de Z et le domaine C-terminal de la NP [102]. De manière intéressante et dans le cas de MOPV, la protéine Alix/AIP1 est impliqué dans l'interaction Z-NP, probablement par pontage [103]. Des mécanismes additionnels d'incorporation du complexe RNP par la Z peuvent exister. En effet, la Z est aussi capable de lier la polymérase L via son domaine RING et de former des hétérodimères (C.f. **Figure 16**). Tandis que cette interaction a déjà été montrée comme étant importante dans la régulation de la réplication et de la transcription virale (C.f. section III.3.d), d'autres études suggèrent qu'elle pourrait avoir un rôle dans l'empaquetage de la polymérase et de l'ARN génomique [108].

En résumé, la Z joue un rôle essentiel dans l'assemblage des particules virales. De par ses interactions avec GPC, NP, et L, elle assure l'incorporation du complexe RNP dans des vésicules bourgeonnantes contenant les glycoprotéines, amenant à la libération des particules virales.

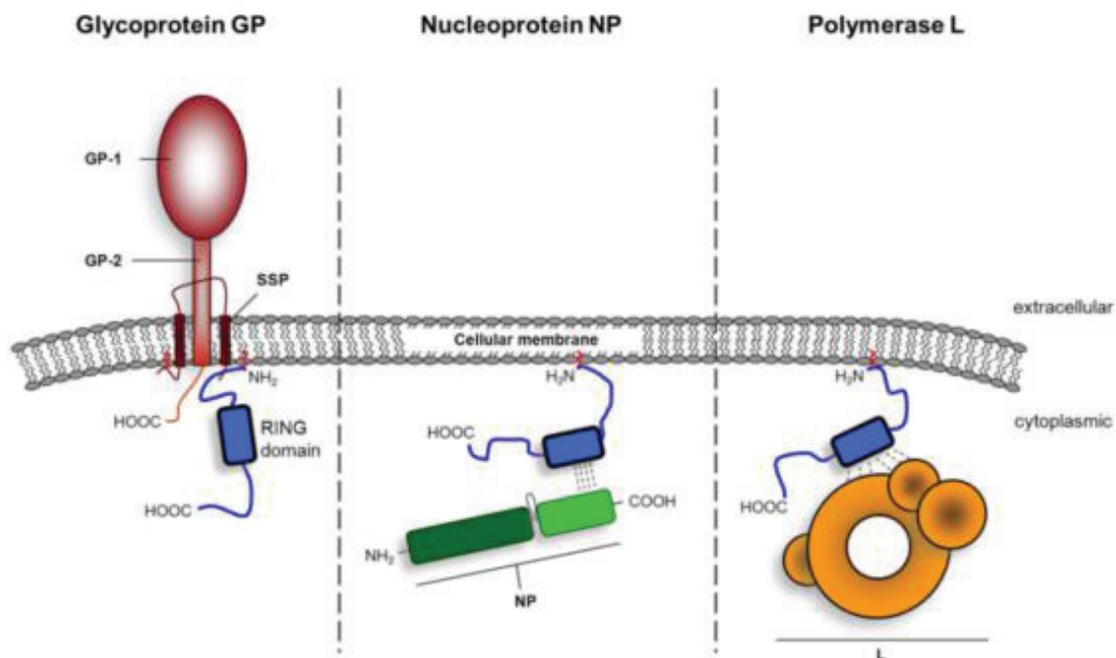


Figure 16 : Interaction de la Z avec les autres protéines virales – rôle dans l’assemblage viral. Issu de [36]. La protéine Z est représentée en bleu, le complexe de glycoprotéine en rouge, la NP en vert et la polymérase en jaune.

III.4.d. *Bourgeoisement et libération virale*

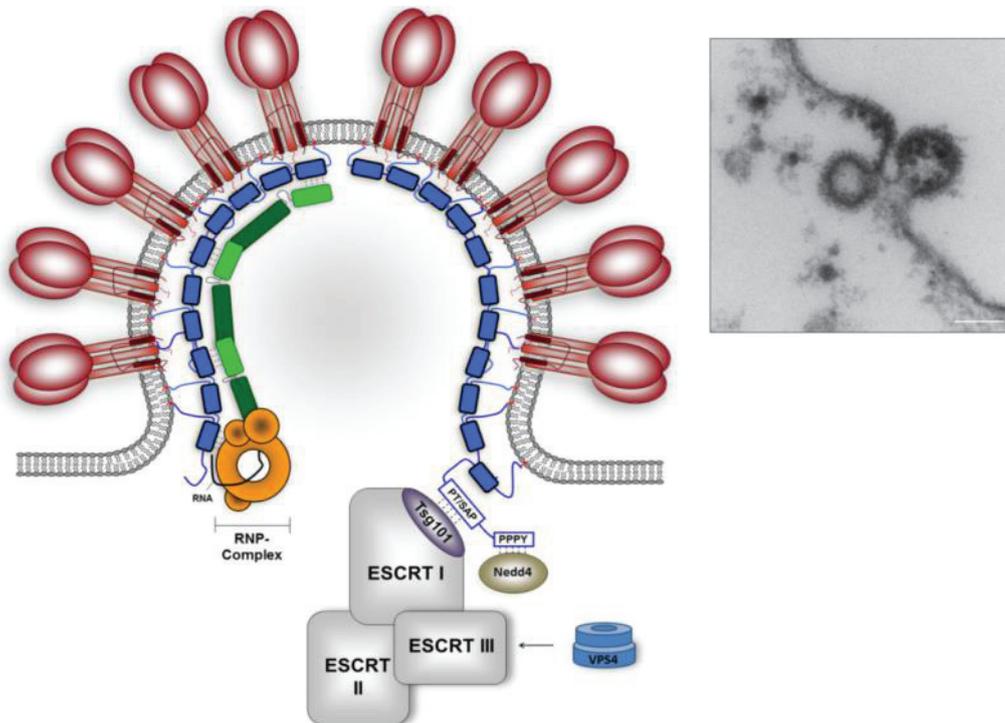


Figure 17 : Bourgeoisement du LASV. Issu de [36]. À gauche se trouve un modèle schématisé des étapes de bourgeoisement des Arénavirus dans lequel la protéine Z apparait en bleu, GP en rouge, NP en vert, et L en jaune. Les domaines tardifs de la Z facilitent l’interaction avec Tsg101 et Nedd4, recrutant les composants de la machinerie ESCRT. Vps4 est requis pour le bourgeoisement efficace des virions. À droite se trouve une photo de microscopie électronique de section ultrafine de cellules Vero infectées par LASV. L’étape de bourgeoisement est représentée. L’échelle blanche représente 100nm.

Les Arénavirus possèdent un cycle de réplication non lytique et bourgeoisent donc à la membrane plasmique. Les étapes finales, qui précèdent la libération virale, impliquent l’enveloppement du complexe RNP par la membrane lipidique dérivée de la cellule hôte contenant le complexe de glycoprotéines matures, suivie des étapes de fission membranaire pendant laquelle le virion naissant se sépare de la membrane de l’hôte. Deux éléments sont essentiels au bourgeoisement des virus à ARN enveloppés, les domaines tardifs et la machinerie ESCRT de la cellule hôte. Les domaines tardifs sont des motifs hautement conservés et sont retrouvés à l’intérieur des protéines matricielles chez de nombreux virus à ARN, notamment les Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus et les Rétrovirus [166]. Ces domaines interagissent avec les protéines du complexe ESCRT [167]. ESCRT contient 4 complexes multiprotéiques

qui déclenchent la formation et le bourgeonnement de vésicules lipidiques intracellulaires vers les corps multivésiculaires, délivrant ainsi leur contenu pour la dégradation par les lysosomes. ESCRT-0 recrute les substrats ubiquitinylés et les concentre au niveau des membranes des endosomes. ESCRT-I et II agissent de paire pour induire la formation d'un bourgeon membranaire et l'internalisation du substrat tandis qu'ESCRT-III induit la scission de la membrane et le relargage du substrat dans les corps multivésiculaires. Enfin, Vps4 termine le processus en dégradant ESCRT-III sur la membrane cible. La Z de LASV est capable d'interagir avec Tsg101 et Nedd4 grâce à deux motifs différents présents dans son domaine tardif (respectivement PTAP et PPPY). Tsg101 est un composant du complexe ESCRT-I tandis que Nedd4 est une E3-Ubiquitin ligase ^[36,126]. Le rôle précis de l'interaction entre Z et Tsg101 et Nedd4 dans le déclenchement du bourgeonnement viral est sur le point d'être élucidé. Des études proposent un modèle dans lequel la Z du LASV interagit successivement avec Tsg101 et Nedd4 ^[36] (C.f. **Figure 17**). L'interaction avec Nedd4 amène à l'ubiquitinylation de la Z et l'interaction avec Tsg101 recrute la machinerie ESCRT, contournant ainsi le processus cellulaire en faveur du bourgeonnement des particules virales. Tsg101 ne reconnaît pas seulement les domaines tardifs mais également les ubiquitines attachées aux protéines, pouvant participer à la régulation des étapes de bourgeonnement du LASV ^[168]. Une fois que la vésicule lipidique, issue de la membrane cellulaire et contenant les GPC, s'est formée autour du complexe RNP, la Z recrute Vps4 pour la fission du bourgeon et le relargage final des particules virales hors de la cellule hôte ^[157]. Le bilan du cycle complet du LASV est présenté en **Figure 18**.

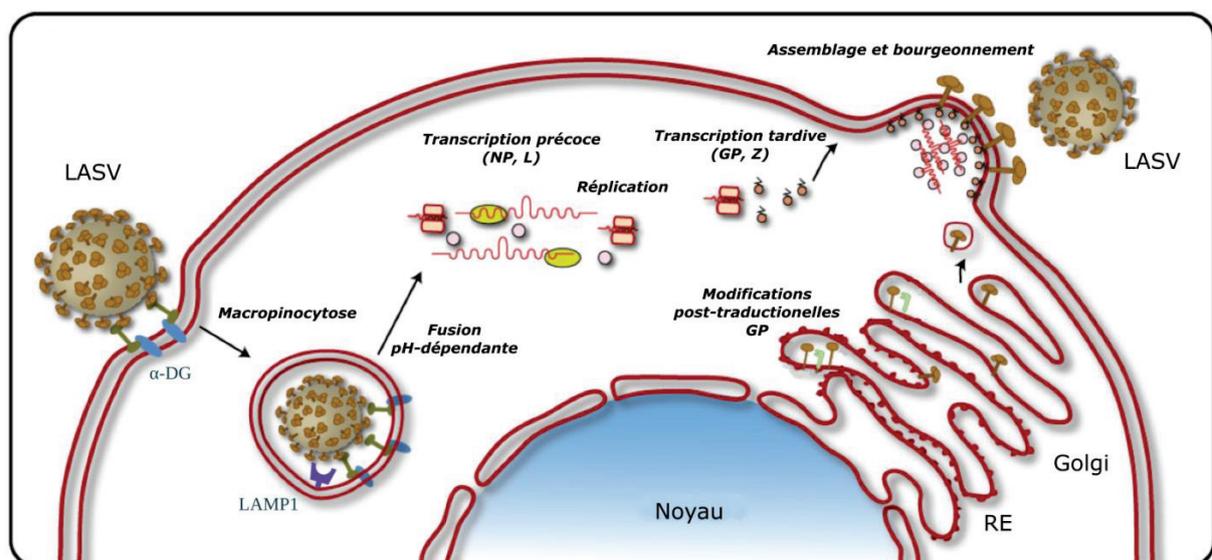


Figure 18 : Représentation schématique du cycle viral du LASV. Issu de ^[169]. Pour les détails, se référer au texte.

IV. Physiopathogénèse et réponses immunitaires associées à la fièvre de Lassa

IV.1. Pathologie de la fièvre de Lassa

IV.1.a. Généralités

La particularité de la FL est sa variabilité considérable au niveau des signes cliniques et de la sévérité, allant de l'infection asymptomatique à la fièvre hémorragique fatale. La plupart des cas (80%) sont asymptomatiques. Cette particularité étant prise en compte, le taux de mortalité de la FL ne dépasse pas 2%. En revanche, le taux de mortalité de la FL chez les patients hospitalisés est compris entre 15% et 20% ^[170], atteignant 50% et plus au cours des épidémies nosocomiales ^[171]. Ce chiffre est estimé à 30% chez la femme enceinte avec un avortement spontané quasi systématique du nouveau-né ^[172]. De manière générale, les chiffres de morbidité et de mortalité de la FL peuvent varier en fonction des souches virales, des méthodes de diagnostic utilisées, des niveaux de soins hétérogènes en fonction des hôpitaux, du mode d'infection, de la dose infectieuse, de la variabilité des sujets et de l'immunité préexistante.

IV.1.b. Signes cliniques et issues de la FL chez l'Homme

Malgré le risque épidémique et le fort taux de mortalité du LASV, peu de choses sont répertoriées en termes de tableaux cliniques. Très peu d'études à large échelle ont été menées depuis la découverte du virus. Seules 3 études incluent plus de 200 cas confirmés ; une au Sierra Leone de 1977 à 1979, une au Libéria entre 1980 et 1986 et une récente au Nigéria de 2011 à 2015 ^[170-173-174]. Il ressort de ces études que les deux sexes de tous les groupes d'âges sont touchés. Bien que la FL soit une FHV, en réalité les saignements sont relativement rares. Les signes et symptômes non spécifiques prédominent. La période d'incubation est asymptomatique et sa durée est très variable, pouvant aller de 3 à 21 jours ^[170]. Le tableau clinique commence par un syndrome grippal non spécifique accompagné de ses symptômes constitutifs, notamment fièvre, myalgies, arthralgies, asthénie profonde et céphalées ^[175]. Le diagnostic spécifique de la FL basé uniquement sur les symptômes présentés ci-dessus est compliqué, voire impossible, en raison des nombreuses autres maladies sévissant dans cette région (malaria, dysenterie, fièvre typhoïde...) et qui entraînent des signes cliniques identiques, menant à

un faux diagnostic. Une pharyngite, le plus souvent exsudative, est un symptôme précoce régulièrement observé au cours de la FL. Des manifestations gastro-intestinales sont fréquentes et ont lieu de manière précoce au cours de l'infection. Ceci inclut nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhées. Des pétéchies (petite taches rouges cutanées) se retrouvent souvent sur les personnes à peau claire, mais pour des raisons inconnues, rarement sur les personnes à peau noire. La conjonctivite est également fréquente mais celle-ci n'est pas accompagnée de démangeaisons ni d'écoulements. L'apparition de toux sèche est possible, mais les manifestations pulmonaires sont peu fréquentes dans les étapes précoces de la maladie. La survenue d'un ictère n'est pas commune au cours de la FL.

Après la phase précoce, deux évolutions cliniques radicalement différentes peuvent être observées. Dans la grande majorité des cas (80%), on observe une défervescence thermique intervenant entre 8 et 10 jours après l'apparition de la maladie. La virémie diminue progressivement jusqu'à disparaître. Le malaise général et l'asthénie peuvent persister encore pendant plusieurs semaines mais la récupération est, le plus souvent, complète. Cependant, une complication peut apparaître au cours de la maladie ou pendant la convalescence : la surdité neurosensorielle uni ou bilatérale, qui affecte 1/3 des survivants et qui peut être permanente dans 2/3 des cas ^[176].

Dans les cas sévères, on observe une dégradation des symptômes entre le 6^e et le 10^e jour de la maladie. Les patients progressent vers une instabilité vasculaire manifestée par l'apparition d'hyperhémies conjonctivales, d'œdèmes de la face et du cou ainsi que de saignements. Les gonflements de la face et du cou sont des symptômes très caractéristiques de la FL mais ne sont pas souvent observés (moins de 20% des cas). Malgré le terme « fièvre hémorragique », les hémorragies ne sont observées que dans moins de 20% des cas également, et jamais au cours des phases précoces de la maladie. L'hématémèse (rejet de sang par la bouche), le méléna (présence de sang dans les selles), l'épistaxis (saignements de nez), et les gingivorragies (saignements des gencives) sont rares. Toutefois, des hémorragies internes venant du tractus gastro-intestinal sont parfois observées. Des complications pulmonaires peuvent apparaître, marquées par un stress respiratoire et des œdèmes pulmonaires. Les fonctions rénales et hépatiques sont également touchées au cours de la FL. Des manifestations neurologiques peuvent également être observées, avec des encéphalopathies accompagnées ou non de crises d'épilepsie et de coma. On ignore si ces complications neurologiques sont dues à un effet direct du virus sur le système nerveux central, à un phénomène immunopathologique ou à des

perturbations métaboliques non spécifiques. Les patients décèdent à la suite d'un choc hypotensif, hypoxique et hypovolémique.

Le cas particulier de la femme enceinte et du fœtus a également été décrit ^[172,177,178]. La FL chez les femmes enceintes est associée à l'infection du fœtus et la perte de celui-ci dans 90% des cas. Le risque de mortalité est fortement augmenté pour la mère, notamment au cours du troisième trimestre. L'évacuation de l'utérus augmente les chances de survie. Un signe clinique spécifique a été observé au cours de FL infantile : l'anasarque, ou syndrome du bébé gonflé. Celui-ci est caractérisé par un œdème généralisé, une distension de l'abdomen et des saignements, et est mortel dans 80% des cas.

Les connaissances de la pathogenèse de la FL sont basées sur de rares données humaines et sur des observations plus étendues faites chez des modèles animaux. Les connaissances sur la pathogenèse et la survenue du choc terminal sont manquantes. L'homme succombe la plupart du temps sans signes hémorragiques et les lésions histopathologiques (décrites plus loin) ne sont pas assez sévères pour expliquer les défaillances multiviscérales et la mort ^[179]. L'instabilité vasculaire et les troubles de l'hémostase constituent la marque de la FL. Cependant, elles représentent la conséquence de l'infection pour lesquelles les causes ne sont toujours pas connues.

IV.1.c. Facteurs pronostics

La grande variabilité d'intensité des symptômes est un phénomène qui caractérise la FL. Plusieurs études ont été réalisées afin de mieux comprendre les signes cliniques responsables de la survie ou de la mort des patients. L'étude la plus récente a été effectuée au Nigéria sur une cohorte de 291 patients ^[174]. Le taux de mortalité était de 24%. Le sexe du patient n'a pas eu d'influence sur le taux de mortalité. Seul l'âge était déterminant. En effet, le taux de mortalité des patients âgés de moins de 50 ans était de 20% tandis que ce taux augmentait jusqu'à 39% pour les patients plus âgés. Tous les enfants âgés de moins de 15 ans, et représentant 3% de la cohorte, ont survécu. Les statistiques ont montré que le risque de mortalité augmentait d'un facteur de 1,4 à chaque décennie. Cette étude a également comparé l'apparition des différents signes cliniques en fonction de l'issue de la maladie (survie ou mort) (C.f. **Figure 19**). Il en ressort que les signes du système nerveux central sévères (coma, crises, tremblements, délires, désorientation, suggérant une encéphalite ou une méningite) ou non sévères (léthargie, vertiges, somnolences) étaient associés à l'issue fatale. De la même manière, les gonflements de

la face et du cou ainsi que les saignements étaient également annonciateurs d'un pronostic défavorable. De manière intéressante, les lésions rénales aiguës, mesurées par le taux de créatinine, étaient fortement associées à la mortalité dans cette cohorte (60% des patients). Il a été observé chez ces patients une plus forte incidence de protéinurie (82%) et d'hématurie (76%), deux signes associés à la mort et corrèlent avec les dommages rénaux. Les fonctions hépatiques, mesurées par le taux d'aspartate aminotransférase (AST) et d'alanine aminotransférase (ALT) ont également été associés à la mort. Il est important de noter que les résultats de cette étude ont une limite : la cohorte provient d'un seul site géographique, le Nigéria, et les souches de LASV circulant dans cette région sont parmi les plus divergentes.

Une autre étude en Sierra Leone, plus ancienne et impliquant 441 cas de FL, s'est également intéressée aux signes cliniques prédictifs de l'issue de la maladie ^[170]. La mortalité dans cette étude était de 16.5%. Au même titre que l'étude au Nigéria, il n'a pas été observé d'impact du sexe sur la mortalité. Cependant, celle-ci était plus importante chez l'enfant et le jeune adulte (10-19 ans), de manière contradictoire avec l'étude précédente. Ici, la pharyngite et la protéinurie étaient les marqueurs les plus spécifiques de la FL. La combinaison de la fièvre et des vomissements était associée à la mort. Contrairement à l'étude effectuée au Nigéria, il n'a pas été observé de marqueurs de lésion rénale.

Enfin, une dernière étude réalisée au Libéria s'est intéressée aux symptômes de 246 patients ^[173]. Les symptômes retrouvés étaient en général les mêmes que pour les études précédentes. Cependant, cette étude ne s'est pas intéressée aux facteurs prédictifs de l'issue de la FL.

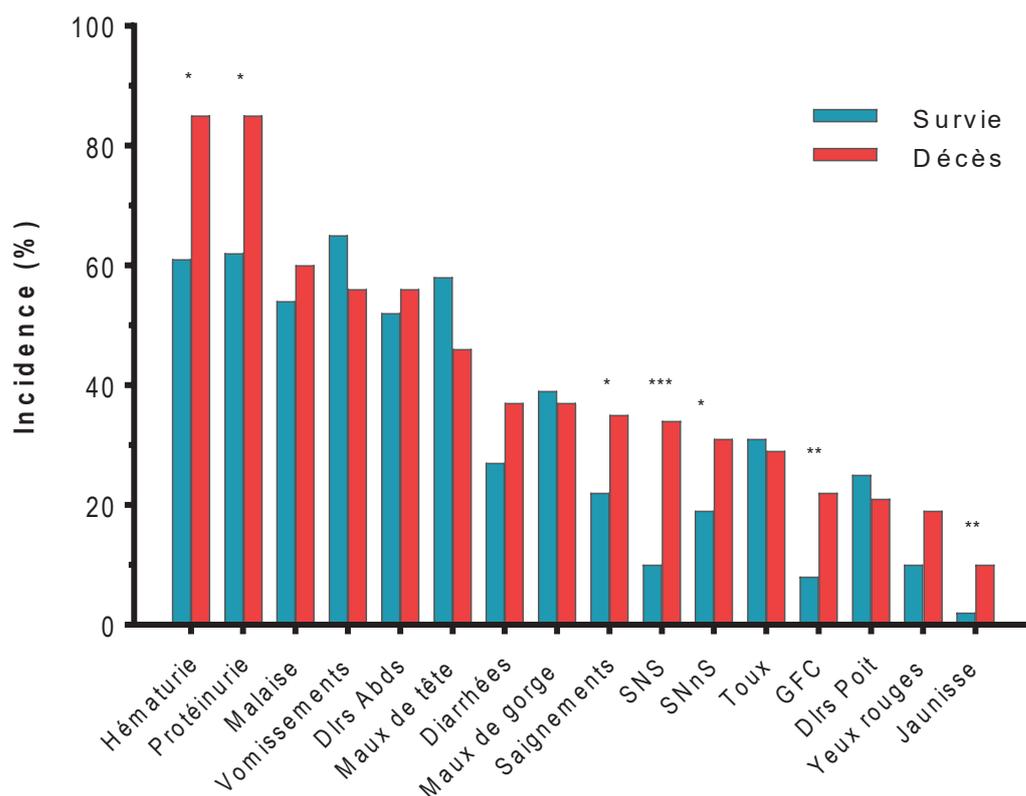


Figure 19 : Signes cliniques et issues de la FL. Issu de [174]. Symptômes classés par incidence décroissante parmi les cas d'une étude sur 291 cas confirmés de FL. Les p-values correspondent à un test χ^2 avec correction de Yates ; *(p-value<0.05), **(p-value<0.01), *** (p-value<0.001). Dlrs Abds (douleurs abdominales), SNS (signes neurologiques sévères), SNNs (signes neurologiques non sévères, GFC (gonflements de la face et du cou), Dlrs Poit (douleurs poitrine).

IV.1.d. Changements histopathologiques chez l'Homme

En raison de son récepteur, l' α -DG, présent dans la plupart des tissus, l'infection par LASV est pantropique. Les observations macroscopiques sont peu nombreuses et se résument à un épanchement pleural, des œdèmes pulmonaires, des ascites et de légères manifestations hémorragiques dans la muqueuse gastro-intestinale [38,180]. Cependant, les observations microscopiques des changements anatomopathologiques dans les organes de patients décédés de la FL sont plus nombreuses. Les études anatomopathologiques chez l'Homme étant anciennes, aucune ne montre la présence du virus au sein des coupes histologiques. Il n'est donc pas possible de corréler les changements histopathologiques avec la présence directe du virus. Celle-ci a été mise en évidence dans différents tissus dans une seule étude primate, plus détaillée en section IV.2.c [181].

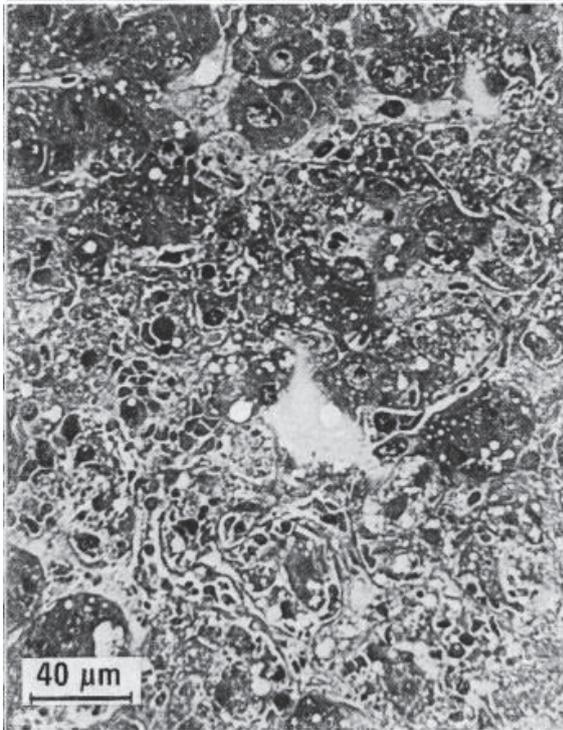


Figure 20 : Nécrose hépatique. Les hépatocytes nécrotiques sont distribués de manière aléatoire formant des foci de cellules contiguës.

masmique dans moins de 20% des hépatocytes (C.f. **Figure 20**, issu de ^[183]). Cette phase pourrait correspondre aux étapes tardives de la virémie et au début des lésions dans le foie. Ces lésions seraient causées par la présence du LASV plutôt que par la réponse immunitaire, en raison de l'absence d'infiltrat de cellules mononucléées. La seconde phase correspond au pic de l'hépatite, caractérisé par une nécrose répandue des hépatocytes (20 à 50% des cellules) et l'apparition de corps phagocytaires. Les dommages hépatocellulaires progressent mais la guérison du foie commence via l'élimination des hépatocytes nécrosés et la régénération cellulaire. La troisième phase est la récupération hépatique, définie par moins de 10% de cellules nécrotiques et par l'apparition de cellules en mitose. De manière intéressante, la corrélation entre les lésions histologiques du foie et les marqueurs de dommages hépatiques plasmatiques, AST, ALT et lactate déshydrogénase (LDH), n'a pas été observée. En conclusion, il ressort de cette étude que les dommages hépatiques varient fortement parmi les patients qui décèdent de la FL, signifiant que l'infection du foie est une condition nécessaire mais pas suffisante dans le chaînon des événements pathologiques amenant à l'issue fatale.

Foie. Les lésions majeures et les plus régulièrement identifiées chez les patients ont été observées dans le foie ^[37,179,182,183]. Bien que la sévérité diffère d'un patient à un autre, l'infection par LASV a induit dans cet organe une hépatite avec quatre caractéristiques principales : 1) une dégénération cytoplasmique focale des hépatocytes ; 2) une nécrose hépatocellulaire distribuée de manière aléatoire ; 3) une réaction des monocytes bordant les hépatocytes nécrosés ; 4) une prolifération des hépatocytes. Ces caractéristiques morphologiques n'ont pas eu lieu dans tous les cas mais ont pu être observées simultanément. Elles ont permis d'identifier trois phases au cours des hépatites de FL fatale. La première phase est la phase de lésion hépatocellulaire active, définie par la présence d'une dégénération cytoplasmique

Organes lymphoïdes secondaires. Les données pathologiques obtenues à partir des autres organes sont moins complètes que pour le foie. En réalité, les changements anatomopathologiques observés dans ces organes sont minimes. Toutefois, il a été observé une nécrose éosinophile au niveau de la zone marginale splénique ^[183]. Cette nécrose était entourée de dépôt de fibrine. Il a par ailleurs été observé une infiltration de cellules mononucléées au niveau de l'endothélium de la veine splénique (C.f. **Figure 21.A**). D'autres phénomènes ont été identifiés, notamment une congestion et une atrophie de la pulpe blanche. Par ailleurs, les changements anatomopathologiques étaient également minimes au niveau des ganglions. Il a été observé une déplétion des follicules avec la présence de débris nucléaires phagocytés. Dans d'autres cas, le follicule était intact mais les centres germinatifs où résident les lymphocytes B, étaient absents. Des cas très occasionnels de phagocytose des érythrocytes ont été notés, sans être spécifiques de la maladie ^[182]. Ces particularités observées dans les organes lymphoïdes ne peuvent s'apparenter à une véritable pathologie.

Glandes surrénales. L'observation microscopique des glandes surrénales a montré la présence d'inclusions cytoplasmiques sphériques acidophiles dans les cellules proches de la jonction entre la zone réticulée et la médulla. Dans la plupart des cas, il s'agissait de cellules provenant de la zone réticulée. De plus, une nécrose des cellules provenant dans la plupart des cas de la zone fasciculée a été détectée avec une légère réaction inflammatoire localisée (C.f. **Figure 21.B**). Cependant et dans la plupart des cas observés, cette nécrose était d'intensité modérée et plus de 90% des cellules apparaissaient viables, ne suggérant pas une insuffisance des glandes surrénales ^[179].

Reins. Les atteintes rénales semblent peu fréquentes chez l'Homme. Des nécroses occasionnelles au niveau de la tubulure et des cellules glomérulaires ont été décrites au cours d'un cas fatal (C.f. **Figure 21.C**). D'autres observations ont montré une congestion et une autolyse de la médulla, avec la présence de lymphocytes et de cellules mononucléées plus grosse pouvant être des lymphocytes activés ^[180]. Ces lésions modestes rarement retrouvées semblent être contradictoires avec l'élévation de la créatinine observée chez certains patients au Nigéria ^[174].

Poumons. Il a été observé dans le poumon une congestion générale, des œdèmes alvéolaires et une pneumonie interstitielle légère sans hémorragies (C.f. **Figure 21.D**). Il a été noté la présence d'un infiltrat cellulaire constitué principalement de cellules mononucléées, mais également de rares leucocytes polynucléaires et de mégacaryocytes ^[182].

Cœur. Peu d'atteintes cardiaques ont été identifiées au cours des FL. Une congestion et un léger œdème interstitiel ont été observés chez les patients. Un léger infiltrat de cellules mononucléées au niveau de l'épicaarde, semblant non spécifique, a été noté (C.f. **Figure 21.E**). Malgré ces petites lésions, aucun signe de myocardite n'a été décrit ^[179].

Tractus gastro-intestinal. Les seules observations faites mentionnent la présence de pétéchies et une inflammation légère de lymphocytes et d'autres cellules mononucléées au niveau de la muqueuse. Ces signes se révélaient être dus à une inflammation chronique et ne seraient donc pas spécifiques de l'infection par le LASV.

Autres. Les lésions dans les autres organes sont inconstantes et probablement pas dues à l'infection par LASV. L'examen du cerveau, du pancréas, de l'ovaire, de l'utérus, du placenta et du sein n'ont pas montré d'altérations pathologiques, bien que la présence du virus ait été identifiée dans la plupart de ces tissus ^[179].

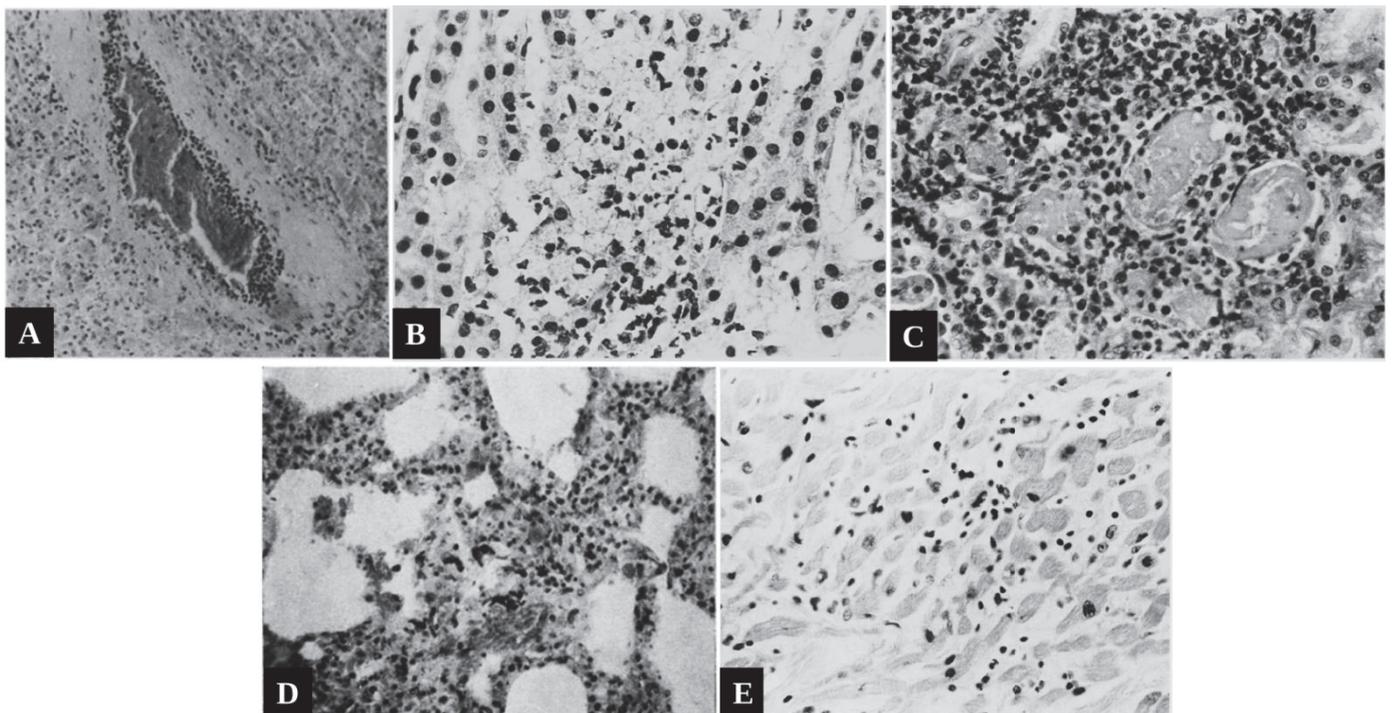


Figure 21 : Changements anatomopathologiques systémiques dus au LASV. Issu de ^[179,180]. A, Rate de patient infecté par LASV montrant une infiltration de cellules mononucléées au niveau du sous-endothélium veineux (grossissement x180). B, Nécroses de cellules de la corticosurrénale avec une réaction inflammatoire modérée (grossissement x440). C, Rein infecté par LASV montrant une nécrose des tubules rénaux entouré par des cellules mononucléaires inflammatoires (grossissement x560). D, Pneumonie interstitielle d'un poumon infecté par LASV, avec une infiltration de cellules mononucléées et de mégacaryocytes (grossissement x180). E, Myocarde d'un patient infecté par LASV caractérisé par une myocardite interstitielle sans nécrose (grossissement x350).

IV.2. Modèles animaux de la fièvre de Lassa

En raison de la difficulté d'accès aux cas de FL humaines sur le terrain, les modèles animaux constituent un outil précieux pour l'étude de la pathogenèse, des réponses immunitaires et pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques et vaccinales. Trois animaux sont utilisés pour l'étude de la FL, notamment la souris, le cobaye et plusieurs espèces de primates non humains (PNH). Un résumé des modèles utilisés est présenté en **Tableau 4**.

IV.2.a. Souris

En règle générale, le modèle murin et notamment les lignées de souris knockout sont très utiles et efficaces pour l'étude des mécanismes pathologiques ou pour tester l'efficacité de traitements ou de vaccins expérimentaux, ceci en raison de leur faible coût et de leur simplicité de manipulation en laboratoire. Cependant, le réservoir du LASV étant un rongeur, l'infection par ce dernier n'est que peu ou pas pathogène chez la souris immunocompétente. En effet, ces souris sont hautement résistantes aux voies d'inoculations périphériques (injection sous cutanée, intramusculaire et intrapéritonéale). L'inoculation intracérébrale du LASV chez la souris adulte immunocompétente a entraîné des signes cliniques proches de ceux observés chez la souris infectée par LCMV, notamment une inflammation des méninges et du plexus choroïde. Ces souris étaient toutefois résistantes à l'infection systémique, ne reproduisant pas la physiopathologie caractéristique de la FL retrouvée chez l'Homme ^[184].

Plus récemment, des lignées de souris immunodéficientes ont été testées pour leur susceptibilité à l'infection par le LASV. Ces souris sont déficientes pour le récepteur de l'IFN-I (α/β), dites $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$, pour le récepteur de l'IFN-I et II (α/β et γ), dites $IFN\alpha/\beta\gamma R^{-/-}$, ou pour STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1 factor), dites STAT1 KO. Les souris $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$ et $IFN\alpha/\beta\gamma R^{-/-}$ ont développé une infection disséminée et des dommages tissulaires dans le poumon, le foie, les reins et le cerveau proches des lésions observées chez l'humain ^[185]. Ces souris n'ont pas développé de symptômes prononcés, hormis une perte de poids transitoire. Toutefois, les souris $IFN\alpha/\beta\gamma R^{-/-}$ ont récupéré de l'infection plus rapidement. Cependant, le LASV n'a pas induit d'infection fatale dans aucune de ces deux souches, contrairement à ce qui a été observé pour les Arénavirus du nouveau monde, notamment les virus Junin, Tacaribe et Machupo ^[186-188]. Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude utilisant des souris $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$. L'infection de ces mêmes souris avec des Arénavirus non pathogènes, notamment par les virus Mopeia, Mobala et Morogoro, a été rapidement con-

trôlée et n'a pas induit d'inflammation dans ce modèle, contrairement à LASV ^[189]. Ces données montrent que les souris $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$ peuvent reproduire certains aspects de la virulence des Arénavirus observés chez l'humain. LASV a également causé une maladie plus grave chez les souris STAT1-KO. En effet, celles-ci ont présenté une infection disséminée dont l'issue était fatale après une injection intrapéritonéale de 10^4 PFU (particules formant unité) du LASV. Les souris ont développé une perte de poids importante et une hypothermie précédant la mort. De plus la pathologie dans les organes ressemblait aux lésions observées dans les cas humains de FL ^[190]. Des observations intéressantes ont également été faites dans des souris chimériques exprimant les molécule du CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) humain à la place du CMH-I murin ^[191]. Dans ces souris transgéniques, LASV a induit une maladie avec des lésions histologiques proches de celles retrouvées chez l'Homme infecté par LASV, suggérant un rôle clé de la réponse immunitaire des cellules T lié au CMH-I dans le contrôle de l'infection par LASV. La déplétion du répertoire T dans ces souris infectées par LASV a par ailleurs empêché la survenue de la maladie, suggérant un double rôle des cellules T, protégeant de l'infection contre LASV mais pouvant également renforcer la pathogenèse.

L'ensemble de ces données montrent que l'infection par LASV est traitée de manière différente entre le système immunitaire des souris et celui de l'Homme. Bien que les souris immunocompétentes ne représentent pas un bon modèle d'étude de la FL, les souris transgéniques déficientes au niveau du récepteur de l'IFN, du CMH ou de STAT1 peuvent être une solution économique pour tester le potentiel immunogénique d'un vaccin. Néanmoins, si un modèle animal pertinent doit imiter au mieux la pathologie et les réponses immunitaires retrouvées au cours de la FL, l'utilisation de la souris est discutable.

IV.2.b. Cobaye

Le cobaye est un autre rongeur pouvant être utilisé comme modèle animal pour étudier la FL. Les souches S13 et Hartley sont couramment utilisées pour l'étude des fièvres hémorragiques à Arénavirus. En effet, la souche S13 a été décrite depuis plus de 30 ans comme modèle létal d'infection par le virus Machupo ^[192]. Le virus Guanarito, responsable de la fièvre hémorragique vénézuélienne, a également entraîné une maladie létale chez la souche S13 et la souche Hartley, ressemblant à la maladie développée par l'Homme ^[193]. Les infections par les virus Pichinde et Tacaribe ont également été étudiées chez le Cobaye S13, bien que la pathologie ne ressemblait pas précisément à celle développée par l'Homme ^[194,195]. Plus récemment, le virus

Lujo a été utilisé pour induire une maladie sévère chez la souche S13 très proche de la fièvre développée dans les rares cas humains, comprenant l'infection pantropique, la thrombocytopénie et la perturbation de la coagulation ^[196].

Contrairement aux exemples ci-dessus, la pathogénicité du LASV chez le cobaye dépend de la souche de l'animal et de la souche virale lors de l'inoculation. Par exemple, la souche Josiah du LASV a induit une maladie létale chez la souche S13 alors que la souche Hartley était plus résistante, avec 30% de mortalité. Les cobayes S13 possédaient des titres viraux dans les tissus ciblés (ganglions, glandes salivaires, rate, pancréas et poumon) plus importants que les cobayes Hartley ^[67,197]. Les animaux infectés par LASV ont développé une insuffisance respiratoire avec des œdèmes pulmonaires, très proche des lésions observées chez l'Homme. Les animaux ont également développé une myocardite modérée et des foyers de calcification au niveau hépatique. Les lésions au niveau des surrénales, de la glande salivaire et du cerveau étaient rares et légères. Il y a deux différences majeures dans la pathogenèse de la FL entre le cobaye et l'Homme. Chez l'Homme, LASV est particulièrement hépatotropique et les patients avec une FL sévère développent une nécrose hépatocellulaire tandis que les altérations chez le cobaye se résument à quelques foyers d'hépatocytes calcifiés. De plus, LASV est myocardiotropique chez le cobaye alors que cette particularité n'a pas été retrouvée chez l'Homme. De même, plusieurs isolats issus de cas cliniques humains graves sont bénins chez le cobaye, et certains d'entre eux sont létaux chez le singe cynomolgus ^[198].

En résumé, la pathologie développée chez le cobaye se rapproche de celle observée chez l'Homme, notamment pour l'étude des lésions pulmonaires. Cependant la pathogenèse et les réponses immunitaires associées dans ce modèle ne permettent pas de comprendre les raisons de la mort due à la FL chez l'Homme.

IV.2.c. Primates non humains



Figure 22 : Les principales espèces de PNH utilisés comme modèle pour la FL

Les PNH constituent le modèle d'excellence pour l'étude de la FL. Ces derniers possèdent la plus étroite proximité phylogénétique avec l'Homme et partagent avec ce dernier de nombreuses similitudes morphologiques, physiologiques et immunologiques. Plusieurs espèces ont été évaluées pour leur potentiel à reproduire la FL humaine, notamment le capucin, le singe écureuil, le ouistiti, le babouin hamadryas, le singe vert, le singe cynomolgus et le singe rhésus ^[67,181,199-214]. Les principales espèces utilisées sont reportées en **figure 22**.

Des études dans les années 1980 et 1990 se sont intéressées aux aspects cliniques et pathologiques de l'infection par LASV chez le babouin hamadryas et chez le singe vert ^[202,214]. Evseev *et al.* ont montré en 1991 que les babouins infectés contractaient une maladie proche de la FL sévère humaine, avec notamment l'apparition de fièvre, de manifestations cliniques et hémorragiques caractéristiques ainsi qu'une forte virémie. Cependant plusieurs décennies se sont passées sans qu'il n'y ait d'études supplémentaires. Aucune autre étude jusqu'à aujourd'hui n'a, par ailleurs, utilisé le babouin hamadryas pour l'étude de la FL. En 1987, Peters *et al.* ont montré que les singes verts infectés avec une faible dose du LASV (10-15 PFU) ont succombé à l'infection tandis qu'un challenge à haute dose (10^6 PFU) n'a été que partiellement létal. Au même titre que le babouin hamadryas, une seule étude faite par Walker *et al.* en 1975 a utilisé le singe vert comme modèle de la FL ^[67].

Le singe capucin et le singe écureuil, quant à eux, ont été permissifs à l'infection mais ont survécu à une forte ou une faible dose du virus au cours d'études réalisées par Walker *et al.* en

1975 ^[53,200]. Le virus a été détecté dans tous les organes des singes écureuils infectés, mais le foie, les ganglions et les reins ont été les premiers organes ciblés. La rate, le cœur et le cerveau ont été infecté plus tardivement au cours de l'infection. Les lésions histopathologiques étaient par ailleurs modérées. Elles comprenaient une nécrose des centres germinatifs dans la rate et les ganglions, une myocardite, une artérite, une nécrose des tubulures rénaux et une inflammation du plexus choroïde, de l'épendyme et des méninges. Une régénération des hépatocytes, probablement dû à la guérison des lésions hépatiques, ont également été observées.

Les singes rhésus et cynomolgus ont été plus largement utilisés au cours des 40 dernières années pour évaluer l'efficacité de vaccins ou de traitements candidats, et dans une moindre mesure pour étudier la pathogenèse ^[181,199,203–212,215]. La pathologie induite par le LASV dans ces animaux est donc mieux caractérisée. L'infection par LASV chez le singe rhésus entraîne des changements pathologiques, notamment l'apparition de pétéchies et, dans certains cas, d'un épanchement pleural, d'une fièvre et d'une conjonctivite. La virémie apparaît entre le 5^e et le 10^e jour d'infection et augmente progressivement jusqu'à la mort des animaux ou jusqu'au seuil critique de souffrance nécessitant une euthanasie. Le virus a été détecté dans tous les organes, c'est-à-dire glandes surrénales, rate, foie, duodénum, jéjunum, colon, moelle osseuse, ganglions, thymus, cœur, poumon, reins, muscle, pancréas, glande salivaires, ovaires, vessie, cerveau, cervelet, liquide cébrospinal et humeur aqueuse de l'œil. La plus importante quantité de virus a été détectée dans les glandes surrénales, rate, foie, et intestin. Il résulte de l'observation microscopique des organes un agrégat de cellules mononucléées au niveau de l'artère pulmonaire, une nécrose hépatocellulaire, une pneumonie interstitielle, une nécrose des glandes surrénales et de la zone marginale splénique des ganglions lymphatiques, une encéphalite et une uvéite. Par conséquent, les singes rhésus infectés présentent les mêmes lésions histopathologiques que lors de la FL humaine. De plus les organes touchés par le virus se révèlent être les mêmes que chez l'Homme ^[202,208].

Les manifestations cliniques des singes cynomolgus infectés par LASV incluent fièvre, dépression, perte de poids, anorexie, détresse respiratoire, déshydratation, convulsions, œdèmes facial et saignements de nez ^[181,204]. Il a été noté chez ces animaux également l'apparition d'une thrombocytopenie, lymphopénie, hypertrophie des ganglions lymphatiques et de la rate. Au même exemple que le singe rhésus, tous les organes testés sont infectés, notamment la moelle osseuse, les ovaires, le cerveau, le cœur, le pancréas, les ganglions lymphatiques, le poumon, les surrénales, les reins, la rate, le foie. Le titre infectieux est plus important dans le foie et les surrénales. Les dommages tissulaires comprennent une nécrose des hépatocytes et

des surrénales, une inflammation du foie, une alvéolite aiguë, une infiltration de cellules mononucléées dans le rein, une hyperplasie de la pulpe blanche, une pancréatite, une myocardite et une pneumonie interstitielle. Une particularité supplémentaire a été observée chez un singe développant une maladie sévère, notamment des lésions sévères du système nerveux central. Une étude immunohistologique menée par Hensley *et al.* en 2011 a pu également montrer la présence de virus dans les tissus. Il ressort de ces travaux que les cellules de Kupffer, les hépatocytes, les cellules corticales des glandes surrénales et les cellules endothéliales représentaient les cibles les plus fréquentes du LASV ^[181]. Les réponses immunitaires ont également été étudiées dans ce modèle. Il a notamment été observé une augmentation des cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 et eotaxine. Notre laboratoire a également développé le modèle de FL chez le primate, dès 2009. Nous avons pu montrer, au même exemple que Walker *et al.* ^[67] qu'une injection de 10⁷ PFU du virus LASV-AV n'a pas été létale alors que l'injection à 10³ PFU a provoqué la mort de 2 animaux sur 3 ^[204]. Chez ces animaux, nous avons observé globalement les mêmes signes cliniques et les mêmes changements anatomopathologiques que précédemment décrits chez le modèle cynomolgus infecté par LASV. Nous avons montré cependant qu'une réponse cellulaire T robuste et précoce était également importante dans ce modèle pour le contrôle de la virémie et associée à la guérison ^[204]. Les résultats de cette étude, en lien avec le projet de cette thèse, est décrit plus en détail dans la section Problématique & Objectifs. Nous avons également développé des essais vaccinaux prometteurs en utilisant des souches recombinantes du virus MOPV et du virus de la rougeole, protégeant 100% des animaux infectés ^[216, en préparation]. Ces études sont détaillées en section V.3.b.). En résumé, la pathogenèse de LASV est bien étudiée chez le singe cynomolgus, et celle-ci reproduit fidèlement la FL chez l'Homme. De plus, ce modèle imite également les mêmes réponses immunitaires que celles développées au cours de la FL humaine. Le singe cynomolgus représente donc un modèle de choix pour étudier la fièvre de Lassa, aussi bien au niveau de la pathogenèse que pour le crible de candidats vaccins et de traitements.

Les expériences basées sur les PNH dans une animalerie de confinement de niveau 4 sont extrêmement coûteuses et difficiles à mettre en place. Le développement d'un modèle moins cher et plus pratique est donc intéressant. Dans cette optique, des études ont été faites sur le ouistiti (*Callithrix jacchus*). Ces singes sont petits (entre 300 et 500g) et permettent l'utilisation de cages plus petites ainsi qu'une plus simple manipulation dans un laboratoire hautement confiné. Carrion *et al.* en 2007 et Lukashevich *et al.* en 2008 ont montré que l'infection expérimentale du ouistiti avec une injection du LASV par voie sous-cutanée en-

trainait une maladie systémique avec de la fièvre, une virémie élevée et une charge virale dans la plupart des tissus ^[213,217]. Il a été observé également une hausse des concentrations d'enzymes hépatiques et une importante morbidité entre les jours 15 et 20 après l'infection. Il a été observé au niveau histopathologique une nécrose et une inflammation hépatique, une nécrose des surrénales, une destruction des organes lymphoïdes et une néphrite interstitielle. La pathologie retrouvée chez le ouistiti est donc fortement similaire à la maladie retrouvée chez l'humain. Ce modèle reproduit également les deux issues de la maladie : la survie ou la mort, au même titre que les singes rhésus et cynomolgus. Les analyses histologiques des tissus lymphoïdes ont mis en évidence une réduction du nombre de lymphocytes B et T ainsi que de l'expression de molécules du CMH-II, suggérant pour la première fois que la réplication du LASV dans les tissus lymphoïdes peut être impliqué dans la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire défectueuse. De plus, cet animal a déjà été utilisé pour évaluer la sûreté et l'efficacité d'un candidat vaccin du LASV, le ML29 ^[217]. Bien que le nombre d'études utilisant le ouistiti soit encore trop faible pour parler d'un véritable modèle de FL, il pourrait néanmoins être très utile dans le futur pour étudier la FL à moindre coût et avec davantage de simplicité.

IV.2.d. Modèles alternatifs

L'accès limité à une animalerie avec un confinement de groupe de risque de niveau 4 amène petit à petit au développement de modèles animaux alternatifs pour l'étude de la FL dont l'objectif est de diminuer le niveau de biosécurité nécessaire.

Par exemple, l'infection des souches Hartley et S13 de cobaye par PICV, un pathogène de classe 2, a été établie pour étudier les mécanismes des phénomènes pathologiques similaires à ceux développés au cours de la FL. Une souche du PICV faiblement adaptée au cobaye Hartley a induit une maladie modérée chez l'animal tandis qu'une souche hautement adaptée, obtenue après 18 passages chez le cobaye, a déclenché une maladie fatale avec des symptômes imitant certaines particularités de la FL ^[218]. Dans les infections létales induites par la souche virulente de PICV, la suppression et non la surexpression de cytokines pro-inflammatoires était associée au choc terminal ^[219]. Ce modèle peut être intéressant pour étudier les phénomènes de syndrome ressemblant au sepsis retrouvé au cours des formes sévères de FL. PICV a également été adapté à la souche de cobaye S13, dans lequel il affecte particulièrement le foie, la rate et les surrénales ^[220]. Ce modèle est intéressant pour substituer l'étude des lésions anatomopathologiques du foie au cours de la FL. Toutefois, la pathologie induite

dans cet organe au cours de cette étude est plus importante que celle induite au cours de l'infection du cobaye par LASV.

De la même manière mais cette fois ci chez le PNH, l'infection du singe rhésus avec la souche viscérotropique du LCMV (LCMV-WE) a induit chez celui-ci une maladie fatale semblable à la FL. Celle-ci est étai caractérisée par une perturbation des fonctions hépatiques et une importante prolifération des hépatocytes ^[221]. LCMV-WE a également induit une augmentation simultanée de la virémie et de la synthèse d'IL-6 et de TNF- α dans le plasma des animaux infectés ^[222]. Ce résultat corréle avec la hausse d'IL-6 observée dans le plasma des singes et des humains infectés par LASV ^[183,204]. L'utilisation de LCMV ne nécessite plus qu'un confinement de niveau 3, faisant de ce modèle un outil alternatif intéressant pour l'étude de pathologies similaires à la FL.

Enfin, l'infection de singes avec le virus de fièvre hémorragique simienne (SHEV) offre un modèle d'étude de FL nécessitant un confinement de niveau 2 ^[223]. SHEV est un arterivirus découvert en 1964 responsable d'une fièvre hémorragique chez le singe. L'infection du singe rhésus avec le SHEV a induit une fièvre hémorragique avec un taux de mortalité de 64%. Les signes cliniques et pathologiques associés à la maladie (coagulopathie, modulation des cytokines circulantes, implication des systèmes hépatiques et lymphoïdes) étaient proches de ceux développés au cours d'autres fièvres hémorragiques causées par LASV, EBOV ou MARV. Cependant, les phénomènes de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), retrouvé lors de l'infection par le SHEV, ne s'applique pas au cours de la FL, représentant donc une limite à ce modèle d'étude.

Virus/dose	Souche animale	Inoculation	Principales caractéristiques	Niveau confinement	But de l'étude	Ref
Modèle souris						
LASV Josiah 10 ³ PFU	C3H/Sn	i.c.	Mortalité 100 % Maladie similaire au LCMV	P4	Recherche de traitements	184
LASV Josiah 10 ⁴ PFU	IFN α / β R ^{-/-}	i.p.	Mortalité 0 % Infection disséminée contrôlée	P4	Recherche de traitements	185
LASV Josiah 10 ⁴ PFU	IFN α / β γ R ^{-/-}	i.p.	Mortalité 0 % Infection disséminée rapidement contrôlée	P4	Recherche de traitements	185
LASV Josiah 10 ⁴ PFU	STAT-1 KO	i.p.	Mortalité 100 % Infection disséminée	P4	Pathogénicité	190
LASV Ba366 10 ⁶ PFU	HHD (tgHLA-A2.1)	i.v.	Mortalité 22 % Infection disséminée Immunopathologie	P4	Pathogénicité et immunopathogénicité	191
Modèle Cobaye						
LASV Plusieurs souches 10 ³ PFU	S13	s.c., i.p.	Mortalité 100 % Imite la FL humaine avec pathologie hépatique prédominante	P4	Pathogénicité, recherche de traitements, vaccins	189 190 198
	Hartley		Mortalité 30 %			
Modèle PNH						
LASV 15 PFU 10 ⁶ PFU	Singe vert	inconnu	Mortalité 100 % Mortalité	P4	Pathogénicité	202
LASV Bah 10 ^{6,8} TCID50	Singe écureuil	i.m.	Mortalité 0 %	P4	Pathogénicité	200
LASV Plusieurs souches Plusieurs doses	Singe rhesus	s.c., i.m.	Mortalité 100 % Reproduit la pathologie de la FL humaine	P4	Pathogénicité, efficacité vaccins et traitements	193,198,200, 201,207,211,
	Singe cynomolgus	s.c., i.m.	Mortalité variable Reproduit la pathologie et les réponses immunitaires de la FL humaine	P4	Pathogénicité, immunogénicité, efficacité vaccins et traitements	181,204,207, 211,212,205, 206
	ouistiti	s.c.	Mortalité 100 % Infection systémique Pathologie proche de la FL	P4	Pathogénicité, immunogénicité, efficacité vaccins et traitements	213,217
Modèle alternatif						
PICV Passage 2 ou 18 2.10 ³ PFU	S13 Hartley	i.p.	Mortalité 0 % Pathologie modérée à sévère Lésions hépatiques	P2	Pathogénicité Recherche traitements	218–220
LCMV-WE 10 ³ PFU	Singe rhesus	i.v.	Infection fatale ressemblant à l'hépatite de la FL	P3	Pathogénicité Recherche vaccins	221,222
SHEV 5.10 ¹⁻⁵ PFU	Singe rhesus	i.m.	Mortalité 64 % Maladie proche de la FL	P2	Pathogénicité Recherche vaccins	223

Tableau 4 : Modèles animaux de la fièvre de Lassa. Issu de ^[224]. i.p., intrapéritonéale ; i.c., intracérébrale ; i.v., intraveineuse ; s.c., sous-cutanée ; i.m., intramusculaire.

IV.3. Physiopathogénèse

IV.3.a. Étapes de la pathogénèse

Malgré les progrès récents dans la compréhension des interactions hôtes pathogènes, notamment grâce à l'utilisation de modèles animaux, la connaissance que nous avons de la pathogénèse de la FL reste encore parcellaire. En effet, nos connaissances ne nous permettent pas de comprendre l'enchaînement des événements pathogéniques qui ont lieu pendant le développement de la maladie et qui conduisent à la mort des patients.

Après son inoculation, le LASV peut franchir la barrière épithéliale via deux sites majeurs : les voies respiratoires ou les muqueuses. En effet, la voie d'infection supposée la plus fréquente chez l'Homme se produit dans les muqueuses au niveau du poumon après inhalation de substances solides contaminées (poussières, fèces, urine séchée) ou par micro lésions cutanées. Plusieurs voies d'inoculations différentes ont été testées chez le primate pour modéliser le franchissement des muqueuses chez l'Homme ^[181,205,211]. La voie intramusculaire a été étudiée, mais celle-ci n'est pas pertinente car trop éloignée du mode de contamination chez l'Homme. La voie sous cutanée est également utilisée dans de nombreuses études et se rapproche davantage de l'infection cutanéomuqueuse observée chez l'Homme. Enfin, le mode de contamination par aérosols a également été développé et demeure le modèle le plus pertinent aujourd'hui. Cependant, les symptômes, les mécanismes pathogéniques et l'issue de la maladie observée chez les animaux infectés par ces différentes voies d'inoculation sont globalement similaires, suggérant que la voie d'inoculation n'a pas d'impact sur la physiopathogénèse dans le modèle primate. *In vitro*, le virus infecte principalement les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) (monocytes/macrophages et cellules dendritiques) ^[145,146,212]. Il est supposé que le virus LASV migre ensuite dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate) avant sa dissémination, via la circulation lymphatique et sanguine, dans les organes systémiques, notamment le foie, le pancréas, les reins, les glandes surrénales, le tube gastro-intestinal, les poumons, le cœur et l'endothélium. La migration des monocytes-macrophages dans ces tissus cibles induirait une infection secondaire permissive dans le parenchyme constituant ces tissus. La distribution très large du virus n'est pas surprenante étant donné que son récepteur, l' α -DG, est exprimé dans la plupart des tissus. Comme il a été vu précédemment, la réplication du LASV dans les organes n'entraîne pas d'effet cytopathique, et les dommages retrouvés dans ces tissus ne sont pas assez sévères pour causer une défaillance de l'organe et induire la mort du sujet ^[182]. Le virus peut cependant être isolé dans tous ces organes chez

l'humain et chez les modèles animaux ^[67,179,181,199,200,204,209] et l'étendue de la virémie chez les patients est un facteur prédictif de l'issue de la maladie. En effet, les patients atteints d'une FL fatale ne parviennent pas à limiter la réplication virale, qui augmente jusqu'à la mort, tandis que les survivants ont un titre infectieux initial plus bas et contrôlent rapidement l'infection ^[225]. Ces observations ont également été faites chez le singe ^[202-204,208,209]. Les plus hauts titres viraux sont observés dans le foie, le poumon, la rate, les reins et les glandes surrénales chez les patients et les PNH infectés ^[179,204,209,212]. La nécrose hépatocellulaire est d'ailleurs la caractéristique histopathologique la plus consistante et la plus fréquemment retrouvée chez les patients et les singes au cours de la FL, bien que celle-ci ne soit pas assez sévère pour induire une défaillance de l'organe. Les titres les plus faibles se retrouvent au niveau du système nerveux central (SNC) chez les macaques bien qu'aucune lésion n'ait été détectée dans les tissus nerveux chez les patients infectés. Les signes neurologiques ne sont pas fréquents au cours de la FL mais sont prédictifs d'une issue dramatique. Une seule étude effectuée sur le singe cynomolgus a mentionné, au niveau histopathologique, l'existence d'une méningoencéphalite dans le cerveau et le cervelet ainsi qu'une nécrose des neurones et des cellules gliales aux étapes terminales de la maladie ^[181]. Chez l'humain, le LASV a été identifié dans le liquide cébrospinal de patients atteints de symptômes neurologiques au cours de la FL ^[78,170,226]. Au cours d'un cas clinique, le LASV a pu être identifié dans le liquide cébrospinal mais pas dans le sérum, suggérant que le LASV pouvait persister dans le SNC et contribuer à la pathogenèse ^[78].

Une lymphopénie transitoire affectant la lignée lymphoïde (cellules CD4+, CD8+, NK et B) est observée de manière précoce au cours de la maladie, suivie d'une leucocytose environ deux semaines après la survenue des symptômes ^[181,204,210,213,227]. La réplication virale dans les tissus et notamment dans le foie augmente fortement les taux plasmatiques d'AST et ALT au cours de la maladie chez les humains et le PNH tandis que cette hausse est plus modérée dans les cas non fatals ^[181,204,208,213,225,228,229]. Ces marqueurs témoignent de lésions hépatiques, mais également de lésions tissulaires plus générales.

Les hémorragies sont une particularité des FHV. Cependant, au cours des infections par les Arénavirus pathogènes, les signes hémorragiques seuls ne sont pas suffisants pour expliquer l'issue fatale de la maladie. Ceci est particulièrement vrai pour la FL où les saignements sont trop faibles et trop rares pour contribuer au choc terminal responsable de la mort des patients ^[230]. De plus, seulement de légères lésions vasculaires ont été observées au niveau histologique au cours d'un cas clinique fatal ^[179]. La FL est cependant associée à une perturbation de

l'hémostase, marquée par une thrombocytopénie modérée et une baisse de la fonction plaquettaire chez les patients et les primates [210,227]. Cette dernière semble être liée à une protéine plasmatique qui n'a toujours pas été caractérisée [231]. Il n'a pas été détecté de D-dimères, produits de dégradations de la fibrine, dans le sang des Hommes ou des PNH infectés par LASV [181,210,227]. Ces produits de dégradations de la fibrine permettent l'identification de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), un phénomène impliqué dans le choc terminal au cours des infections à Filovirus [232]. La perturbation de l'hémostase induite par le LASV peut donc être centrale dans la pathogenèse. Cependant, les mécanismes par lesquels l'infection par le LASV affecte la fonction des cellules endothéliales est encore inconnue. Ces mécanismes peuvent comprendre des effets directs du virus et des effets indirects, menant peut-être à la production de facteurs solubles qui pourraient impacter la fonction des cellules endothéliales. Au cours des fièvres hémorragiques induites par les virus Ebola ou Marburg, les altérations des fonctions vasculaires sont attribuées principalement aux réponses immunitaires induites par le virus, notamment la production excessive de TNF- α et IFN- γ , deux cytokines pro-inflammatoires, partageant certains aspects du syndrome de choc septique [233]. L'infection *in vitro* par le LASV de cellules endothéliales humaines HUVEC et de monocytes/macrophages a montré d'importantes différences dans la pathogénicité entre LASV et les Filovirus [234]. En effet, l'infection par LASV dans ces cellules est hautement productive et ne produit pas d'effets cytopathiques. De plus, l'analyse du sérum des patients et des PNH atteints de FL n'a pas mis en évidence la présence d'une hypersécrétion de cytokines, ou « choc cytokinique ». Ce phénomène, entraînant des effets néfastes de l'inflammation, est caractéristique des fièvres hémorragiques à Filovirus [181,204,232,235]. Un potentiel rôle *in vivo* des facteurs solubles de l'inflammation dans la perturbation de la fonction des cellules endothéliales induite par le LASV ne peut cependant pas être exclu. En résumé, les mécanismes impliqués dans le choc terminal précédant la mort des patients atteints de FL sévères demeurent inexpliqués. L'infection des différents tissus par le LASV, notamment l'endothélium vasculaire, le foie et les glandes surrénales, peut induire une perturbation de la perméabilité vasculaire de manière directe ou indirecte. Le choc terminal peut impliquer un déséquilibre de la distribution des fluides entre les espaces intravasculaires et interstitiels des vaisseaux sanguins, couplé à des défauts de coagulation et peut-être une dérégulation de la pression sanguine.

En résumé, les données réunies jusqu'à présent ne permettent pas de retracer les successions d'évènements physiopathologiques menant à l'issue fatale. Les hypothèses sont les suivantes (C.f. **Figure 23**) :

- A partir du site initial d'infection, le virus infecte les CPA résidentes et se réplique sans les activer (les réponses immunitaires sont détaillées en section IV.4).
- La haute affinité du LASV pour l' α -DG lui permet, une fois le virus passé dans la circulation lymphatique et sanguine, de se répliquer dans la plupart des organes
- L'absence d'activation des CPA empêcherait l'élimination du virus par le système immunitaire, induisant une immunotolérance qui facilite sa propagation à travers les différents tissus.
- La répllication non contrôlée du LASV entraîne de fortes charges virales dans les organes, notamment les hépatocytes, les cellules du cortex des glandes surrénales et les cellules endothéliales, contribuant aux troubles de la perméabilité vasculaire et de coagulation. Il en résulte une hypotension, une hypoxie et une hypovolémie, pouvant mener au choc terminal et à la mort des patients.

IV.3.b. Modèle de la pathogenèse

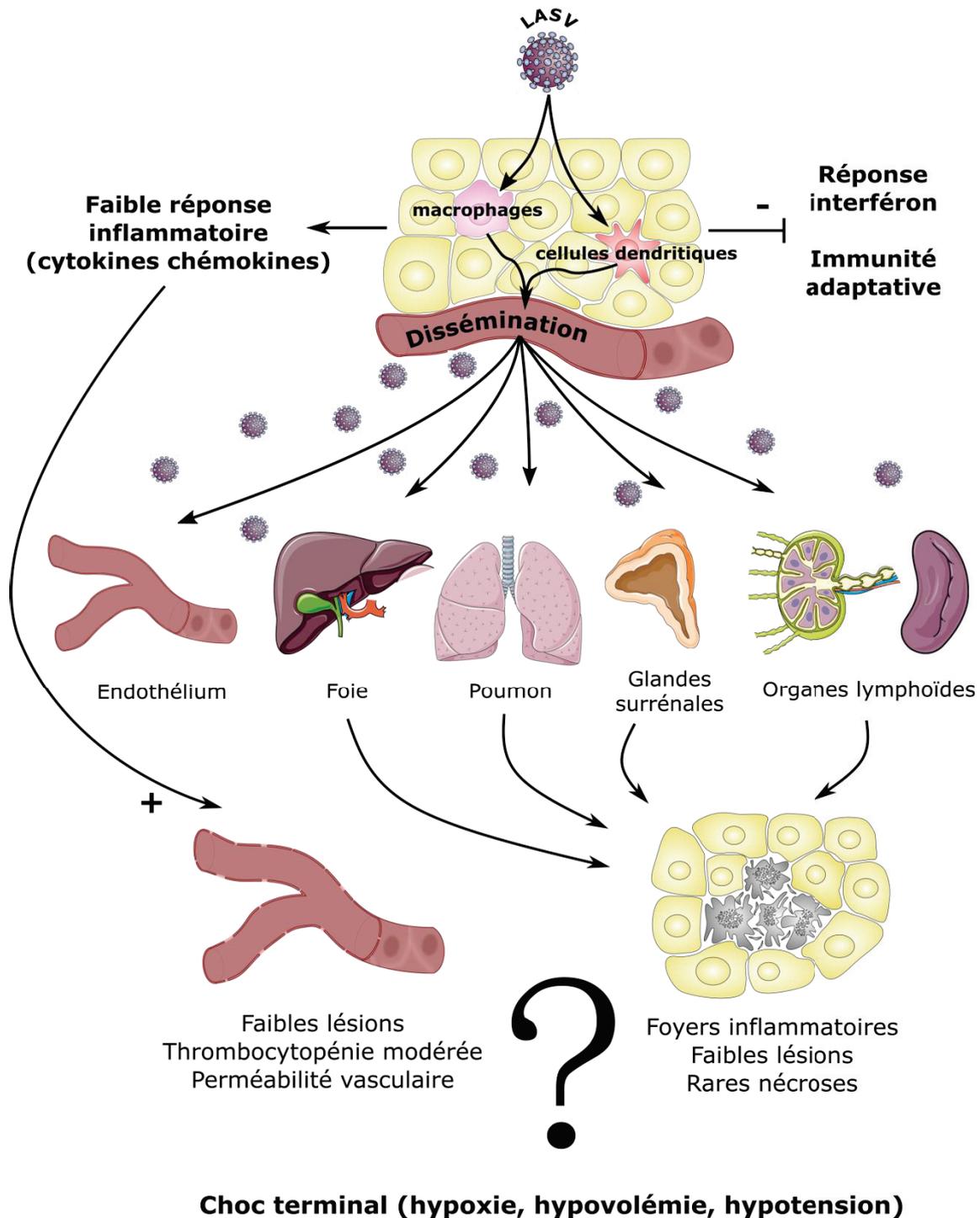


Figure 23 : Modèle de la pathogenèse du virus Lassa. Macrophages et cellules dendritiques (DC) représentent les premières cellules cibles *in vitro* du LASV. Le virus se réplique dans ces cellules sans les activer, empêchant la synthèse d'IFN-I et l'activation de la réponse immunitaire adaptative. L'infection des macrophages et des DC n'induit qu'une faible production de cytokines. Le virus passe ensuite dans la circulation sanguine et lymphatique et se réplique dans les organes systémiques, en particulier le foie, les glandes surrénales et la rate. L'infection du foie entraîne la libération de transaminases hépatiques et peut provoquer une nécrose hé-

patocellulaire. LASV peut également infecter directement les endothéliums et causer de légères lésions au cours des formes sévères de FL. La perturbation de la perméabilité vasculaire couplée à une défaillance multiviscérale peut mener au choc terminal observé chez les patients succombant à l'infection. Les mécanismes précis responsables de la mort du patient impliquent des effets directs et indirects du virus qui ne sont toujours pas connus aujourd'hui.

IV.3.c. Persistence du virus

Au cours d'une étude vaccinale, il a été observé que les singes survivants à l'infection par le LASV éliminaient le virus de la circulation au bout de 14 jours post-challenge. Cependant, l'ARN viral était toujours détectable dans les tissus de ces animaux par RT-PCR au bout de 112 jours après l'inoculation du virus. Le virus répliquatif n'a pas pu être isolé à cette période, suggérant soit une persistance très faible du virus soit la présence de virus défectif ^[211]. Des observations similaires ont été faites pendant l'infection aiguë de souris par LCMV où du virus infectieux a été détecté en très faibles quantités au bout de 80 jours après l'infection ^[236]. Plus récemment, il a été observé, chez un patient ayant contracté une infection par LASV au Togo et rapatrié aux Etats Unis, une réponse cellulaire T-CD8+ anormalement élevée et prolongée, suggérant une présentation antigénique virale à long terme. En effet, il a été détecté chez ce patient de l'ARN viral persistant dans le sperme, ainsi qu'une inflammation de l'épididyme, longtemps après la disparition de la virémie. Cela indique que l'appareil reproducteur mâle peut représenter un site de persistance du LASV, comme cela est observé pour le virus Ebola ^[237,238]. La persistance du LASV chez le PNH a également été mise en évidence récemment dans une étude où de l'ARN viral a été détecté en immunohistochimie dans des zones périvasculaires du cerveau, du cœur, des reins et du foie, 45 jours post infection chez des animaux ayant survécu à une FL ^[215]. Notre laboratoire a également pu identifier de la persistance virale dans l'humeur aqueuse de l'œil et dans l'urine 30 jours après l'infection chez un singe immunisé contre le LASV au cours d'une étude vaccinale (papier en soumission).

Environ un tiers des survivants de la FL développent, pendant les phases tardives de la maladie ou bien au cours de la convalescence, une surdité neurosensorielle (SN) pouvant être unilatérale ou bilatérale ^[176]. Parmi ces patients, environ deux tiers développent une SN permanente avec un degré variable de perte d'audition. La FL est associée avec une incidence de SN dans les pays endémiques qui dépasse considérablement les déficits d'auditions liés à une infection ailleurs dans le monde. La SN n'est pas une complication rare au cours des infections virales. Le LCMV est également associé à une perte d'audition congénitale ^[239] et les

herpesvirus, le VIH, la rougeole et les oreillons peuvent également être associés à une perte de l'audition à la suite de l'infection. Trois mécanismes ont été avancés pour expliquer cette perte d'audition : des dommages de l'oreille interne liés à la réponse immunitaire contre l'infection, liés au virus lui-même, ou bien liés à la combinaison des deux. La compréhension du mécanisme est freinée en raison de la difficulté d'accès aux échantillons des patients. Cependant un modèle de souris STAT-1 KO reproduisant la SN humaine associée à la FL a été développé ^[190]. Ces souris ont contracté une SN 16 à 45 jours après l'infection à un taux similaire à la maladie humaine. Les données histologiques ont montré des lésions au niveau des cellules du ganglion spiral et du nerf cochléaire ainsi qu'un épaissement de la strie vasculaire, une infiltration de cellules sanguines au niveau de la scala tympani, et une légère perte des cellules ciliées internes et externes. La présence d'antigènes du LASV ainsi que de lymphocytes CD3⁺ a aussi été observée dans les régions lésées. Au contraire, les souris IFN $\alpha/\beta\gamma$ R^{-/-}, qui n'ont pas développé de SN, possédaient des titres viraux plus élevés que les souris STAT1-KO ainsi qu'un marquage positif du LASV dans l'oreille interne mais pas de marquage positifs de lymphocytes T CD3⁺. Les dommages observés sur les cellules ciliées peuvent indiquer des dommages directs causés par le virus sur la cochlée. La présence de cellules CD3⁺ uniquement dans les souris STAT1-KO supportent l'hypothèse de lésions de l'oreille interne liées à la réponse immunitaire. Une recherche approfondie et l'utilisation d'un nouveau modèle de SN chez le PNH, en cours de développement, est nécessaire afin d'identifier clairement le mécanisme impliqué dans la surdité liée à la FL.

IV.4. Les réponses immunitaires au cours de la FL

On distingue classiquement deux types de réponse immunitaire : la réponse innée et la réponse adaptative, intervenant lors de périodes différentes à la suite d'une infection. L'immunité innée a été défini initialement comme tout mécanisme de défense intervenant rapidement sans notion de mémoire ni de spécificité de l'antigène. Cependant, cette notion d'immunité innée sans mémoire est remise en question par de récentes études. Celles-ci montrent, chez des modèles mammifères, qu'une protection contre une réinfection par un pathogène se produit indépendamment des cellules de l'immunité adaptative, un phénomène appelé « mémoire immunitaire innée » ^[240]. Participent à l'immunité innée des facteurs solubles comme le complément, ou des populations cellulaires comme les cellules dendritiques (DC), les macrophages, les neutrophiles et les cellules NK (Natural Killer). L'immunité adaptative

est, quant à elle, spécifique de l'antigène et intervient avec un certain délai. Elle nécessite une étape d'activation des lymphocytes T. Elle est caractérisée par sa « mémoire », car parmi les lymphocytes T activés persisteront des lymphocytes T circulants capables de proliférer à nouveau lors d'infections ultérieures. La réponse adaptative peut être une réponse de type cellulaire, observée au cours d'infections par des pathogènes intracellulaires, ou une réponse humorale, avec activation par les lymphocytes T des lymphocytes B producteurs d'anticorps, réponse plutôt observée en cas d'infection par des pathogènes sécréteurs de toxines ou des pathogènes extracellulaires. La plupart de nos connaissances sur les réponses immunitaires au cours de la FL provient de l'étude des modèles animaux, ou de l'étude *in vitro* de cellules humaines. Ces réponses chez les survivants et leur comparaison avec ceux qui ont succombé à l'infection sont détaillées dans cette partie.

IV.4.a. La réponse immunitaire innée

Les premières cibles : les cellules présentatrices d'antigènes. Les CPA, notamment les macrophages mais surtout les DC, jouent un rôle clé au sein du système immunitaire. Ces cellules font le lien entre immunité innée non spécifique et immunité adaptative spécifique. Elles interagissent avec les cellules NK dans le cadre de l'immunité innée, et elles sont les seules cellules à pouvoir activer des lymphocytes T naïfs par la présentation des antigènes du « non soi » à leur surface. Les DC se présentent sous deux stades d'activation. Immatures, elles sont capables de phagocytter les corps étrangers et expriment peu de molécules du CMH I et II à leur surface. Après phagocytose ou activation par un signal (chimiokines, cytokines, molécules de surface, protéine kinase R (PKR)), les DC mûrent, perdant leur capacité à phagocytter, tout en acquérant des marqueurs de migration (CCR-7) à leur surface, une augmentation des quantités de CMH-I et II ainsi que l'expression de molécules de costimulation comme CD40, CD80 et CD86. Elles sont, à ce stade, capables de sécréter de grandes quantités de cytokines, notamment l'IFN-I. C'est seulement dans cet état activé que les DC sont capables de migrer du site d'infection vers les organes lymphoïdes secondaires, via la circulation lymphatique, pour y activer les lymphocytes T naïfs résidents ^[241].

Au cours de la FL, le LASV cible initialement les CPA *in vitro*, notamment les macrophages et les DC ^[145,146]. Ces cellules sont permissives à l'infection par le LASV mais la réplication du virus ne permet ni leur activation ni leur maturation. Afin d'évaluer l'ampleur de la dérégulation des CPA au cours de l'infection par LASV, un Arénavirus non pathogène a été utilisé avec le LASV et leur capacité à activer les CPA a été mesurée. MOPV est phylogénétique-

ment très proche du virus LASV et partage le même réservoir. Cependant, MOPV est non pathogène chez le PNH [211,242]. Comme pour LASV, l'infection des DC ou des macrophages par MOPV a été productive. Contrairement à LASV, les DC et dans une moindre mesure les macrophages, ont fortement été activées par MOPV et ont abouti à l'augmentation de l'expression des marqueurs de CMH I et II, CD80, CD86 et CD40 à leur surface ainsi que la synthèse d'IFN-I et IL-6 [243]. Ces données indiquent que la forte activation des CPA par MOPV peut être l'élément clé conduisant à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative protectrice. Au contraire, l'incapacité de LASV à activer les CPA, ou sa capacité à empêcher l'activation de ces cellules, est déterminante dans la pathogénicité. De plus, le défaut d'activation des CPA en réponse à l'infection par LASV peut induire une tolérance immunitaire au virus induite par ces cellules, menant à l'absence de réponse immunitaire puis à l'immunosuppression [244]. Il est important de noter que ces résultats sont issus de modèles *in vitro* de monocytes isolés à partir de poches de sang et dérivés artificiellement en DC, ne reflétant pas précisément ce qui se passe dans un système *in vivo*. Ils supportent néanmoins fortement l'idée que la perturbation du rôle des CPA par le LASV joue un rôle certain dans la pathogénèse de la FL. Cette inactivation des CPA conduit à une absence générale de la réponse immunitaire adaptative, phénomène observé au cours des formes fatales de FL.

La réponse inflammatoire : rôle des cytokines. La présence de signaux de dangers (DAMP) ou de motifs associés aux pathogènes (PAMP) est perçue par les cellules immunitaires, notamment les CPA, via les PRR. Les mastocytes et les CPA présentes dans les tissus infectés sont les premières cellules activées par des signaux de dangers. En réponse à cette activation, elles libèrent des cytokines, des chimiokines et d'autres composés regroupés sous le terme de médiateurs de l'inflammation. Les conséquences fonctionnelles de ces médiateurs sont l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le recrutement des leucocytes et l'élimination du pathogène responsable de l'inflammation. Les cytokines peuvent être pro- ou anti-inflammatoires et permettent la communication entre les cellules immunitaires et l'orientation de la réponse en fonction de la nature du pathogène détecté. Les chimiokines, quant à elles, sont des cytokines impliquées dans la migration cellulaire. Elles sont sécrétées par des cellules sentinelles dans les tissus après stimulation par des DAMP ou PAMP et dirigent la migration de populations leucocytaires vers le tissu enflammé.

Les interférons. Les trois types d'IFN : type I (IFN α et IFN β), type II (IFN γ) et type III (IFN λ) constituent la première ligne de défense contre les infections virales. Les interférons sont sécrétés suite à la reconnaissance des PAMP par les récepteurs TLR ou RLR (RIG-I like re-

ceptor) présents dans la cellule et agissent de manière paracrine et autocrine au niveau du site d'infection. Ils conduisent, après fixation à leur récepteur et différentes cascades de signaux intracellulaires, à la régulation positive d'une centaine d'ISG (IFN-stimulated genes) dont l'objectif est de supprimer l'infection directement ou indirectement (C.f. **Figure 22**) ^[245]. Par exemple, la tetherin est un ISG capable d'empêcher le bourgeonnement du LASV ^[246]. Il a été montré *in vitro* que l'activation de la synthèse d'IFN-I par l'utilisation exogène de lipopolysaccharide (LPS) ou de poly(I-C) empêchait fortement la réplication du LASV dans les macrophages et les DC ^[146]. De plus, l'utilisation d'IFN-I recombinant a fortement diminué la production de particules infectieuses du LASV dans les macrophages et DC infectées alors que l'IFN-II et -III n'a pas eu d'effets ^[146]. La réponse IFN-I est donc cruciale dans le contrôle de l'infection par le LASV. Cette observation se retrouve également dans les modèles animaux où les souris immunocompétentes sont résistantes à l'infection mais pas les lignées déficientes pour le récepteur de l'IFN-I et/ou II (souris $IFN\alpha/\beta R^{-/-}$ et $IFN\alpha/\beta\gamma R^{-/-}$) ^[185]. Notre laboratoire a confirmé l'importance de l'IFN-I en comparant la réponse cytokinique entre des cynomolgus survivant et d'autres succombant à l'infection par LASV. L'IFN- α a été surexprimé transitoirement à des temps très précoces après l'infection chez les singes qui survivent tandis que cette protéine n'a été surexprimée que bien plus tardivement, et juste avant la mort, chez les animaux morts de la maladie ^[204]. Ces observations montrent que la réponse IFN-I joue un rôle déterminant dans la FL en contrôlant la réplication virale, ce qui détermine dès le début de l'infection la sévérité de la maladie.

Les cytokines et chimiokines. Bien que l'inflammation soit nécessaire au contrôle de l'infection, celle-ci, lorsqu'elle n'est pas contrôlée, peut avoir des effets délétères et perturber de manière importante la perméabilité vasculaire et la coagulation, menant à la mort du patient au cours d'un phénomène appelé « choc cytokinique ». Bien que ce phénomène soit marqué au cours de la maladie à virus Ebola, elle demeure bien plus discrète au cours de la FL ^[247]. Certaines études ont montré que les cytokines étaient néanmoins impliquées dans la pathogenèse de la FL. En effet, Schmitz *et al.* ont observé chez un cas clinique atteint de choc hémorragique que la mort du patient était précédée d'une hausse de la concentration plasmatique de $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$ ^[229]. Cependant, au cours d'une autre étude, Mahanty *et al.* se sont intéressés aux cytokines circulant chez les patients infectés et n'ont observé aucun changement dans la concentration en $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$ chez les cas fatals ^[235]. Ces résultats suggèrent que le $TNF\alpha$ et $IFN\gamma$ sont élevés chez une fraction de patients avec une FL fatale ou pendant une fenêtre de temps précise avant la mort. Ces études ont également montré que l'IL-8 et la

chimiokine CXCL10 étaient secrétées chez les personnes survivant à l'infection alors que la présence de ces cytokines était imperceptible chez les patients avec une issue fatale. Chez tous les patients fébriles de l'étude, les niveaux des médiateurs IL-12, IL-6 et RANTES étaient élevés, quelle que soit l'issue. Lors de l'infection expérimentale des PNH, il a été observé dans notre laboratoire une augmentation transitoire et précoce de la sécrétion d'IFN- α chez les cynomolgus survivants tandis que cette réponse était tardive chez les morts ^[204]. Il a également été montré que l'IL-6 était détectée uniquement au cours des phases tardives dans le plasma des animaux décédés ^[181,204,206]. De même, des taux élevés d'ARNm codant les chimiokines CXCL10 et CXCL11 étaient présents dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et dans les ganglions de tous les animaux infectés ^[204]. Lukashevich *et al.* ont montré que des singes rhésus infectés avec LCMV-WE, représentant un modèle alternatif de FL, présentaient une élévation de la concentration plasmatique d'IL-8 et CXCL10 ^[221]. Il a également été détecté une hausse de l'IL-1 β , IL-12/23, IL-8, et de l'IFN- γ dans le plasma des singes infectés, quelle que soit l'issue de la maladie. Une étude basée sur une approche de puce à ADN s'est intéressée à la réponse des PBMC de singes infectés mortellement par le LASV ^[205]. Il a été observé une augmentation de la réponse immunitaire innée couplée à une absence de réponse cytokinique, à l'exception des cytokines IL-27 et IL-6 qui étaient surexprimées. De manière générale, il est important de noter que les résultats observés dans les différents modèles expérimentaux dépendent du type de singe infecté, de la souche virale utilisée, de la dose et de la voie d'inoculation. Il n'est donc pas évident d'obtenir des résultats homogènes. Enfin, les études *in vitro* ont montré que les DC dérivées de monocytes et les macrophages infectés par LASV ne sécrétaient pas de cytokines inflammatoires (TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12) ^[145,234,248]. Il a également été montré dans notre laboratoire que les macrophages, et dans une moindre mesure les DC, produisaient *in vitro* de grandes quantités de chimiokines en réponse à l'infection par MOPV, tandis que l'infection par LASV n'entraînait qu'une hausse modérée des ARNm codants CXCL10 et CXCL11 dans les macrophages ^[249]. Cette différence de réponse est cohérente avec les précédents résultats montrant que les CPA sont fortement activés par MOPV, mais pas par LASV, en lien avec leur pathogénicité.

Détournement viral de la réponse immunitaire innée. L'importance de la réponse immunitaire innée dans le contrôle de l'infection virale est soulignée par les multiples mécanismes qui ont été développés par les virus au cours de l'évolution pour échapper à cette réponse ^[250]. Comme nous l'avons vu précédemment, LASV est capable d'empêcher la reconnaissance

virale, aboutissant à l'absence d'activation des DC et au maintien du virus dans la cellule (C.f. **Figure 24**). En effet la protéine Z de LASV inhiberait la cascade de signaux initiée par RIG-I et MDA5 en se liant au domaine CARD des deux protéines, empêchant ainsi leur interaction avec l'adaptateur MAVS à la surface des mitochondries ^[138]. Ces données sont cependant en contradiction avec d'autres résultats. Par ailleurs, la NP de LASV utilise deux stratégies différentes pour inhiber la synthèse d'IFN-I. Premièrement, la NP possède un domaine exonucléase avec une haute spécificité pour l'ARN double brin, entraînant sa dégradation ^[96-99]. Cette activité piège probablement l'ARN viral qui n'est pas directement impliqué dans la réplication et la transcription et empêche sa reconnaissance par les RLR. Deuxièmement, la NP est capable de se lier à IKK ϵ et d'empêcher son rôle activateur des facteurs de transcription IRF3 et NF κ B ^[100,251]. Par conséquent, LASV utilise une stratégie pour éviter sa reconnaissance par les RLR et d'autres stratégies, plus en aval, pour empêcher la cascade de signalisation menant à la synthèse d'IFN-I. De plus, il a été montré que LASV pouvait se lier aux récepteurs TAM (AXL et TYRO3), servant de récepteurs auxiliaires du virus ^[140]. De manière intéressante, l'activation des TAM est requise pour l'entrée des virus Lassa et Ebola. Il a été montré pour le virus Ebola que sa liaison aux récepteurs TAM déclenchait une cascade de signaux amenant à la régulation positive des protéines SOCS1 et SOCS3, qui sont de puissants inhibiteurs de la voie JAK-STAT, entraînant ainsi la suppression de la réponse IFN-I ^[252,253]. LASV partageant le même récepteur auxiliaire, le virus peut utiliser la même stratégie pour détourner la synthèse d'IFN-I. Cependant, cette hypothèse de comparaison nécessite des études plus approfondies.

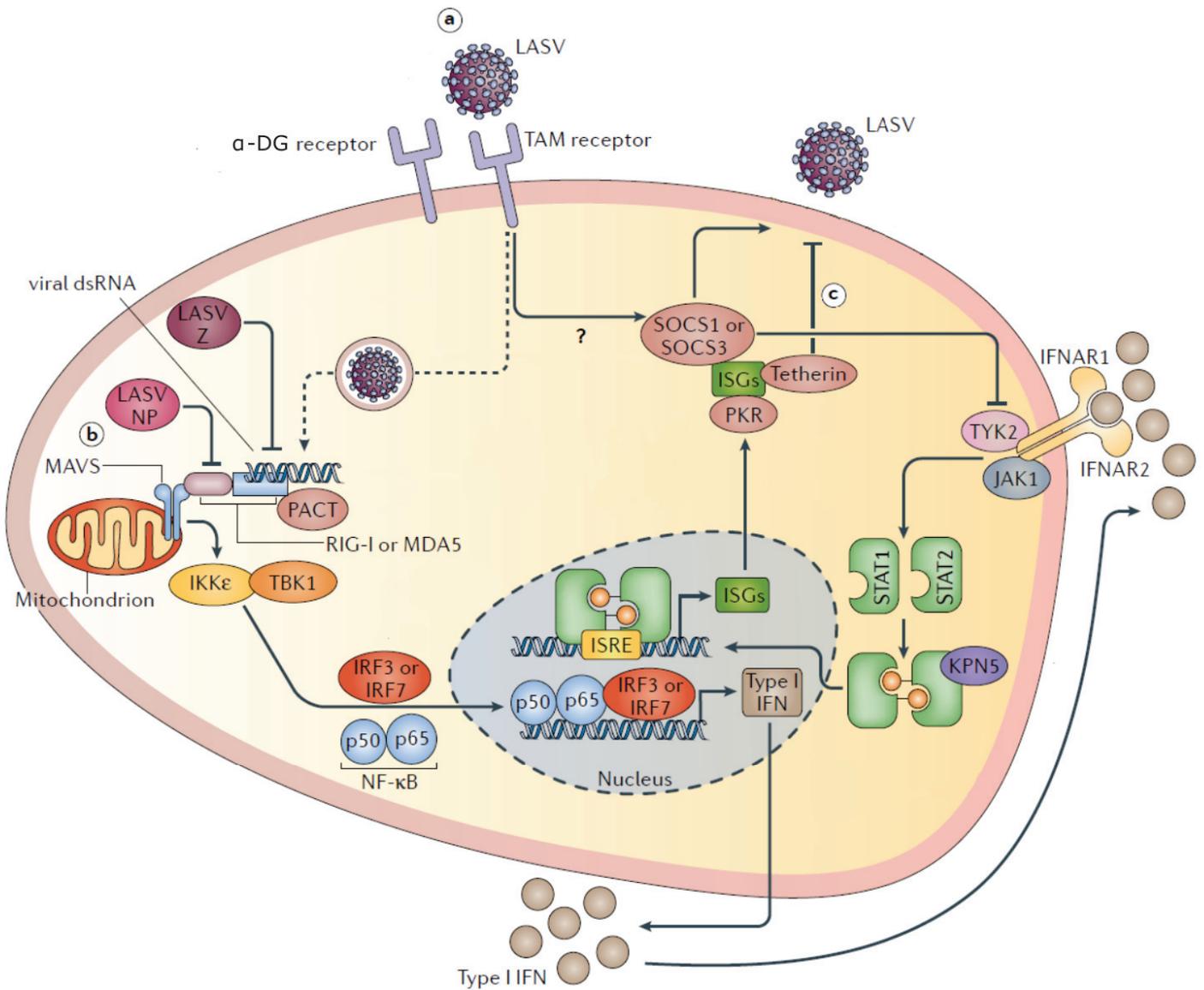


Figure 24 : Réponse immunitaire innée et contournement par le LASV. Issu de [247]. A la suite de l'entrée du LASV et de la réplication du génome, des intermédiaires doubles brins (dsRNA) sont créés. Ces dsRNA sont reconnus par les hélicases RIG-I ou MDA5 dont l'interaction avec MAVS à la surface des mitochondries active les kinases IKK ϵ et TBK1, menant à la translocation de NF κ B et IRF3 et/ou IRF7 dans le noyau pour initier la synthèse d'IFN-I. L'IFN-I sécrété par la cellule infectée se lie au récepteur de l'IFN (IFNAR) de la même cellule ou des cellules avoisinantes, activant la voie de signalisation JAK-STAT. Une fois activés, les facteurs de transcription STAT se lient au promoteur ISRE pour lancer la transcription de plusieurs ISG, notamment la PKR et Tetherin. Plusieurs stratégies sont utilisées par LASV pour contrer ces voies de signalisations. A, En se fixant à son récepteur auxiliaire TAM, LASV régule possiblement positivement les protéines SOCS1 ou SOCS3, elles-mêmes impliquées dans l'inhibition de la voie JAK-STAT. B, Les protéines du LASV suppriment l'activation des RLR en empêchant la reconnaissance des dsRNA, possiblement médié par la protéine Z, ou en inhibant l'activité des RLR, médié par la protéine NP. C, L'ISG tetherin empêche le bourgeonnement du LASV.

Rôle des cellules NK dans l'infection. Les cellules NK sont des cellules immunitaires qui font le lien entre immunité innée et adaptative. Elles ont une activité cytolytique et sont en parallèle de grandes sécrétrices d'IFN- γ , jouant un rôle important dans la régulation de la différenciation et des fonctions des cellules T. L'activation de ces cellules est contrôlée par un équilibre entre des signaux activateurs et inhibiteurs. Le dialogue entre les NK et les cellules accessoires, notamment les CPA, stimule les fonctions des NK et la réponse immunitaire globale [254]. La réponse des cellules NK suite à l'infection par le LASV n'a été que peu étudiée. Notre laboratoire s'est intéressé à cette réponse et a mis au point un système de coculture entre des APC et des cellules NK humaines [255]. Les résultats montrent que les cellules NK seules ne sont ni infectées ni activées par MOPV ou LASV. Cependant, les macrophages infectés par LASV et MOPV activent les cellules NK mais n'induisent pas la lyse des macrophages infectés ni la synthèse d'IFN- γ . Des résultats similaires ont été obtenues avec LCMV [256]. Cependant, l'infection de cellules dendritiques et de macrophages par un LASV recombinant arborant deux mutations dans le domaine exonucléasique de la NP, induisant une forte synthèse d'IFN-I, a permis l'activation, la dégranulation des cellules NK et la production d'IFN- γ [257]. Cela suggère une élimination des CPA infectées par les cellules NK. Ces données montrent que la NP de LASV est impliquée dans l'inhibition de la réponse des cellules NK médiée par les CPA. Tout comme les études *in vitro*, les cellules NK n'ont été que peu étudiées *in vivo*. Seul notre laboratoire a mentionné une déplétion transitoire des NK, (et des autres populations lymphocytaires), au cours de l'infection de PNH par LASV. Cette lymphopénie des NK apparaît plus importante et plus longue chez les singes qui décèdent de l'infection par rapport à ceux qui survivent. Cependant, des études complémentaires doivent être menées pour déterminer si les NK ont un rôle dans le contrôle de l'infection par LASV *in vivo* [204]. Enfin, aucune donnée clinique sur les patients atteints de FL ne s'est intéressée aux cellules NK.

IV.4.b. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative est induite par la présentation antigénique, orchestrée en particulier par les CPA, et est médiée par les lymphocytes B et T. Il existe deux types d'immunité adaptative : l'immunité cellulaire et l'immunité humorale. L'immunité humorale fait intervenir les lymphocytes B, dont la fonction principale est la synthèse d'anticorps ou immunoglobulines (Ig). La reconnaissance d'un antigène spécifique du « non soi » par les lymphocytes B va induire l'expansion clonale et la spécificité des Ig sécrétées en fonction des

stimuli : IgM, IgG, IgA, IgE. L'association Ig/antigène dans la circulation sanguine va conduire à la formation d'un complexe immun qui sera reconnu par les cellules phagocytaires ou le système du complément, aboutissant à la destruction du pathogène. Les anticorps peuvent également neutraliser directement le pathogène et empêcher sa fixation à la cellule cible ; ce sont les anticorps neutralisants. L'immunité cellulaire fait intervenir les lymphocytes T-CD8⁺ (ou T cytotoxiques) et T-CD4⁺ (ou T auxiliaires). L'activation des T-CD8⁺ et T-CD4⁺ passe par la reconnaissance d'antigènes du « non soi » présentés via le CMH de classe I, et II respectivement, à la surface des cellules infectées. Il en résulte l'expansion clonale des lymphocytes activés et spécifiques de l'antigène. Les lymphocytes auxiliaires assistent les lymphocytes B et T cytotoxiques. Les lymphocytes T cytotoxiques ont pour rôle la suppression directe des cellules infectées. Les fonctions de ces deux types de réponses immunitaires au cours de l'infection par le virus LASV sont étudiées ci-dessous.

La réponse cellulaire T. Les études *in vitro* sur cellules humaines et *in vivo* sur modèles primates ont mis en lumière le rôle crucial joué par la réponse cellulaire T dans le contrôle de la maladie.

Comme il a été décrit précédemment, la FL est caractérisée par une lymphopénie transitoire chez les patients et les PNH ^[181,204,210,213,227]. Chez les primates, il a été observé également une déplétion des lymphocytes de la rate et une déstructuration des follicules des ganglions lymphatiques ^[213]. De plus, les réponses cellulaires T (CD4⁺ et CD8⁺) ont été activées de manière précoce au cours de l'infection et étaient toujours détectées chez les patients après leur guérison ^[258]. Chez les patients survivants, on a observé également une élévation des chimiokines IL-8 et CXCL10, impliquées dans le chimiotactisme des cellules T, alors que leur taux est resté faible au cours des formes fatales, prouvant une nouvelle fois que la réponse T est impliquée dans le contrôle de l'infection ^[235]. Des études se sont intéressées à la caractérisation de la réponse T chez des patients en bonne santé mais séropositifs au LASV ^[259,260]. Leurs PBMC ont pu être très fortement restimulées et ont proliféré lorsqu'elles étaient mises en contact avec NP et la GP recombinante du LASV. Des clones de lymphocytes T-CD4⁺ spécifiques de la NP et de la GP ont ainsi été générés à partir des PBMC, démontrant que les infections asymptomatiques ou paucisymptomatiques sont associées avec une forte réponse T-CD4⁺ et que les épitopes reconnus par les cellules T se situent sur la NP et la GP.

Chez le PNH, les infections qui entraînent une issue fatale ont été caractérisées par une absence d'activation des cellules T-CD4⁺ et T-CD8⁺ et une absence de sécrétions de cytokines

T-spécifiques ^[204]. Des observations similaires ont été reportées dans une étude vaccinale ou les singes contrôles n'ont pas élicité de réponse cellulaire T à la suite d'une injection létale du LASV ^[212]. Il a cependant été montré au laboratoire que les animaux survivants à la FL ont tous développé une activation transitoire mais efficace des cellules T ainsi qu'une prolifération entre le 5^e et le 15^e jour après l'inoculation, démontré par l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 ainsi que le marqueur de prolifération Ki67 ^[204]. De manière intéressante, la restimulation, par des antigènes du LASV, de lymphocytes T issus des ganglions des singes infectés a induit une forte prolifération des T-CD4⁺ et T-CD8⁺ des survivants, mais pas celles des animaux avec une issue fatale ^[204]. D'autres études sont en faveur du rôle crucial de l'immunité cellulaire T dans la protection des PNH contre une infection fatale par LASV ^[211,212] (C.f. **Figure 23**).

De manière intéressante, les données issues de cas cliniques et des modèles animaux corrélaient avec les observations *in vitro* sur cellules humaines. Une comparaison entre MOPV et LASV a montré, dans notre laboratoire, que les DC infectées par MOPV stimulent fortement et durablement les cellules T-CD8⁺ et T-CD4⁺, induisant une forte activation, une prolifération et l'acquisition de phénotypes effecteurs mémoires avec une réponse cytotoxique ^[261]. Au contraire, les réponses des DC infectées par LASV étaient faibles et défectueuses. Dans ce modèle, la différence de réponse des cellules T observées entre LASV et MOPV provenait probablement de la différence dans l'activation des DC. En effet, la coculture entre les cellules T et les DC infectées par MOPV a entraîné la synthèse d'IFN-I, IL-12 et CXCL10, favorisant probablement l'activation des cellules T, phénomène non observé lors de l'infection des DC par LASV. De manière cohérente avec cette observation, il a été observé un regroupement massif des cellules T autour des DC infectées par MOPV ^[262]. MOPV apparaît donc fortement immunogénique, ce qui est cohérent avec son phénotype non pathogène, tandis que LASV n'induit pas de réponses immunitaires adaptatives et peut même avoir des effets immunosuppresseurs, ce qui est cohérent avec sa pathogénicité.

La réponse humorale. L'infection par le LASV induit une forte réponse des anticorps IgM et IgG chez l'Homme et le PNH, et ce dès la première semaine suivant l'infection ^[207,211,217]. Les IgG humaines et primates sécrétées au cours de l'infection aiguë sont dirigées contre NP, GP1, GP2 et Z ^[204,258,263]. Aucune information n'est disponible concernant la protéine L. Cependant, cette sécrétion d'anticorps n'est pas corrélée au contrôle de la maladie et des quantités importantes d'IgM et d'IgG coexistent avec une forte virémie chez l'Homme et le PNH ^[209,211,225]. Il a cependant été montré au laboratoire que cette réponse humorale semblait appa-

raitre plus rapidement chez les singes survivants que chez les singes morts de la FL ^[204]. Les anticorps neutralisants dans le sérum des patients et des singes infectés expérimentalement n'ont pas été détectés pendant la convalescence. Ils sont apparus qu'après la guérison et à de très faibles taux ^[76,225] (C.f. **Figure 25**). Des essais de traitements avec du sérum de patients convalescents ont été effectués au Nigéria sans réel résultat positif ^[264,265]. Une autre étude en Sierra Leone, mieux contrôlée, a confirmé que l'inoculation de sérum de patients convalescents ne permettait pas d'augmenter le taux de survie chez les patients atteints de FL ^[228]. Cependant, l'infection expérimentale de modèles animaux a montré que les anticorps neutralisants pouvaient induire une protection. Par exemple, des cobayes S13 ont été infectés avec une dose létale du LASV et traités avec divers sérums immuns issus de cobayes, de singes, ou de patients convalescents. Peu importe l'origine du plasma, le taux d'anticorps neutralisants injecté aux cobayes était corrélé avec le taux de survie. Plus la dose injectée détenait un index de séroneutralisation élevé, plus la chance de survie augmentait ^[266]. Le même effet a été observé au cours de l'infection de singes cynomolgus par LASV ^[207]. Cependant, ces études semblent montrer que la survie des animaux dépendait de l'administration très précoce (le jour de l'infection, ou peu après) de sérum contenant des anticorps neutralisants. Or, en condition naturelle, aucune trace d'anticorps neutralisants n'a été détectée chez les patients infectés, mettant une limite aux résultats obtenus chez les modèles animaux. De plus, des tests d'immunisation chez les singes ont montré que l'induction d'une réponse humorale ne permettait pas de protéger les animaux contre une injection létale du LASV ^[211]. Il semble donc que l'immunité et la survie au cours de la FL ne dépende pas uniquement de la réponse humorale.

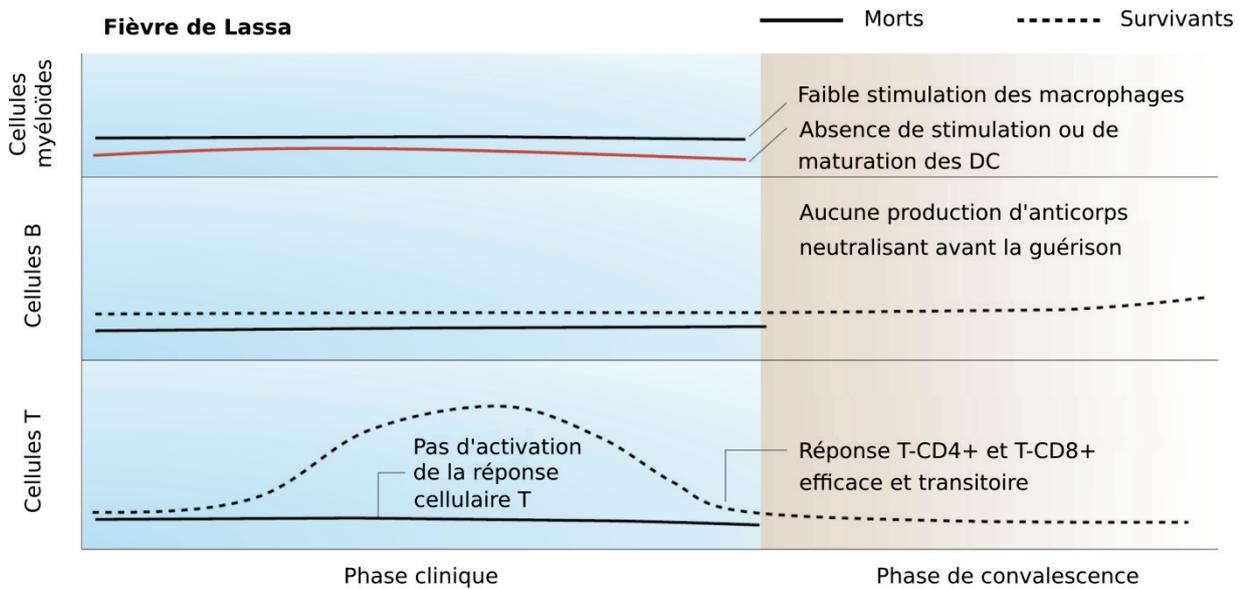


Figure 25 : Réponses immunitaires et issue de la maladie au cours de la FL. Issu de ^[247]. Les cellules myéloïdes (DC et macrophages) sont les cibles initiales du LASV, qui inhibe leur activation et leur maturation. La réponse B, mesurée par la production d'anticorps, montre que la synthèse des IgG et IgM n'est pas corrélée à la survie et la production des anticorps neutralisants n'intervient que très tardivement au cours de la convalescence. Cependant, une activation transitoire mais robuste des cellules T-CD4+ et T-CD8+ est retrouvée chez les survivants.

V. Détection, prévention et traitement de la Fièvre de Lassa

V.1. Diagnostic

Le diagnostic clinique de la FL est non spécifique en raison des symptômes similaires causés par des maladies fébriles également endémiques dans les mêmes régions où LASV est présent en Afrique de l'Ouest, notamment la malaria, les dysenteries, la fièvre typhoïde et les arboviroses ^[267]. Des outils de diagnostic spécifiques, robustes et fiables sont donc nécessaires pour la confirmation des cas, l'établissement d'une zone de quarantaine, l'isolement des patients et le suivi épidémiologique. Aujourd'hui, les outils de diagnostic du LASV comprennent la détection des antigènes viraux, du génome viral et des anticorps IgG/IgM. De nombreux tests ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), RT-PCR et méthodes de culture de tissus ont été développés pour l'identification de l'infection au LASV. Récemment, un diagnostic post-mortem a pu être établi par immunohistochimie sur tissus fixés en formaline.

V.1.a. Détection du génome viral

La RT-PCR est un outil moléculaire rapide permettant la détection de l'ARN viral dans le sang, les tissus ou encore les sécrétions des patients au cours des phases aiguës de l'infection. Cet outil a ainsi été adapté pour les laboratoires mobiles de terrain ^[268-270]. Une confirmation secondaire par ELISA ou par culture du virus est recommandée. En raison de la forte diversité nucléotidique au sein des isolats de LASV, les lots d'amorces utilisés doivent être élaborés en tenant compte des isolats qui circulent dans la région en question ^[77]. Il existe cependant des amorces améliorées qui ciblent des régions des segments S et L hautement conservés, fonctionnant sur plusieurs lignages ^[271].

V.1.b. Détection des antigènes et anticorps

Le diagnostic de la FL peut également être établi par les techniques ELISA, détectant les anticorps IgM et IgG, ou par un test de capture d'antigènes. Les techniques ELISA sont efficaces sur le terrain car elles ne sont pas onéreuses et permettent la réalisation d'un diagnostic sensible et spécifique lors d'une validation croisée avec d'autres méthodes comme la RT-PCR ou l'IFA (immunofluorescence antibody test) ^[272,273]. Certains kits commerciaux ELISA ont été développés pour la détection de la NP des principaux lignages de LASV au niveau antigénique et anticorps. Il existe également des kits commerciaux proposant des anticorps mono-

clonaux dirigés contre la NP, GP1 et GP2 ainsi que des complexes antigéniques, notamment le virus complet irradié ou la protéine NP recombinante. Des tests rapides de détection d'antigènes ont également été développés dans les régions endémiques d'Afrique. Ces tests sont spécifiques de la NP des lignages II, III et IV et ont été validés avec une sensibilité et une spécificité respectives de 85 et 98,7% par rapport à la RT-PCR. Ce test a la particularité d'être peu onéreux, rapide (15 min) et nécessitant un faible volume de sang ^[274]. La technique ELISA a cependant des limites. En effet, une cross-réactivité est possible avec les autres Arénavirus de l'ancien monde antigéniquement proche de LASV ^[28,275]. De plus, les ELISA ne sont pas toujours fiables. En effet, la population des régions endémiques possède souvent des IgG anti-LASV suite à une forme peu sévère de FL contractée antérieurement. Par conséquent, la présence d'IgG n'est donc pas corrélée à la phase aiguë de la maladie et la présence d'IgM n'est pas détectable au cours des phases très précoces. Pour cette raison, les diagnostics sérologiques doivent être sensibles pour la détection d'IgM et les hausses d'IgG doivent être interprétées avec précaution. Cette technique nécessite donc le développement de réactifs standardisés et performants pour la révélation antigénique ou sérologique.

V.1.c. Isolement du virus

L'isolement du virus dans des cultures de cellules est une méthode de diagnostic qui peut être utilisée au cours de la phase aiguë de la maladie ^[276]. L'isolement se fait par titrage mais cette méthode présente un défaut car elle nécessite une semaine ou plus de culture dans un laboratoire de confinement de niveau 4 ^[277].

V.2. Traitements

Aujourd'hui, seule la ribavirine peut être utilisée contre la FL. Les possibilités de traitements sont limitées et dépendent de la phase de la maladie où ils sont administrés aux patients. Les traitements symptomatiques incluent les analgésiques comme le paracétamol, cependant, les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont proscrits en raison du risque accru de saignements. La thrombocytopénie peut être corrigée par une transfusion de plaquettes. La transfusion de sang est prescrite chez les patients anémiques présentant des pertes de sang. Les diarrhées observées chez la moitié des patients entraînent des pertes d'électrolytes qui peuvent être corrigées par injection d'électrolytes par voie intraveineuse. Lorsque cela est possible, des injections de fluides par voie intraveineuse sont également administrées aux patients en perte fluïdique afin de maintenir un volume vasculaire physiologique ^[278].

V.2.a. Ribavirine

La ribavirine, un analogue de la guanosine, est un antiviral à large spectre qui a montré une certaine efficacité dans les modèles singes et au cours d'un essai clinique en Sierra Leone [209,228,279]. La ribavirine a protégé des primates d'une injection mortelle du LASV uniquement si elle était administrée par voie intraveineuse ou intramusculaire dans les 5 jours après l'infection. La protection était d'ailleurs d'autant plus efficace si la ribavirine était administrée en combinaison avec du sérum immun [209,279,280]. Chez les patients, la ribavirine a réduit la charge virale dans les tissus et a diminué la mortalité (de 55 à 5%) lorsqu'elle était administrée dans les 6 premiers jours de la maladie et en simultanément avec des soins palliatifs [281]. L'administration par voie intraveineuse était plus efficace que par voie orale, probablement due à l'absorption du composé qui était deux fois moins efficace par voie orale. L'utilisation de la ribavirine pour le traitement des patients est autorisée par l'OMS dans de nombreux pays, y compris pour les cas importés. Cependant, l'utilisation de la ribavirine est limitée, en partie due à ses effets indésirables. En effet, la ribavirine induit une hémolyse et une baisse de l'hématocrite. L'administration orale est plus sévère, entraînant nausées, vomissements, diarrhées, myalgies, fatigue, insomnie et tachycardie. Bien qu'ils soient nombreux, ces effets secondaires ne sont pas mortels [281]. Cette drogue est également tératogène et embryotoxique chez les rongeurs [282]. De plus, le traitement par la ribavirine est cher ; aux Etats Unis, le prix moyen est de 20 000\$ par patient pour un traitement de 10 jours. Par conséquent, il doit être donné par le fabricant aux pays endémiques non solvables. Etant donné le peu de données sur son efficacité, la nécessité de l'administrer dans les phases précoces de la maladie, ses nombreux effets secondaires et son prix élevé, la ribavirine est difficilement utilisable sur le terrain et son administration devrait être considérée au cas par cas. Des essais cliniques supplémentaires doivent être effectués afin de confirmer son efficacité.

V.2.b. Anticorps neutralisants

Comme il a été vu précédemment, le plasma des patients convalescents contenant de fortes concentrations d'anticorps neutralisants a montré des résultats prometteurs chez les modèles animaux (cobayes et PNH) [207,266]. Une récente étude a montré qu'une combinaison d'anticorps monoclonaux humains, qui inter-réagissent avec les GP des principaux lignages du LASV, protègent 100% des singes contre une infection fatale du virus LASV, même si le traitement est donné plus de 8 jours après le challenge [283]. Cependant, si les anticorps neutralisants fonctionnent bien chez les modèles animaux, ils ne parviennent pas à induire une protec-

tion chez l'Homme, probablement à cause de leur faible concentration dans les sérums immuns administrés [76,230,264,265].

V.2.c. Composés expérimentaux

Plusieurs traitements en développement ont également montré des résultats intéressants chez les modèles animaux. Le favipiravir est un antiviral à large spectre ayant validé les phases d'essais cliniques pour les infections au virus Influenza et en cours d'évaluation pour les infections au virus Ebola. Ce dernier a montré une protection à 100% des cobayes et des souris transgéniques contre une infection mortelle par le LASV [284,285]. Récemment, le favipiravir a montré son efficacité chez le singe cynomolgus en protégeant 100% des animaux infectés par une dose létale du LASV [286]. La combinaison de l'IFN- α et de la ribavirine a également protégé 100% des hamsters d'une infection mortelle du virus Pichinde (PICV), servant de modèle de FHV à Arénavirus [287]. La stampidine et la zidampidine, deux analogues de nucléosides, a augmenté le taux de survie chez la souris transgénique, sans les protéger à 100% [288,289]. Enfin, une petite molécule interférant l'étape d'entrée viral des Arénavirus, le ST-193, a montré une protection de 62.5% contre une infection létale du LASV chez des cobayes S13 [290]. Ces composés doivent encore être testés sur des modèles animaux plus proches de l'Homme pour conclure sur leur efficacité, mais leur utilisation en combinaison avec la ribavirine permettrait de réduire la concentration, et donc la toxicité, de cette dernière.

V.3. Prophylaxie

V.3.a. Prévention

En raison de l'absence de traitement réellement utilisable ou de vaccin contre la FL, un intérêt particulier doit être porté sur la prévention. L'objectif est d'éviter au maximum les contacts entre l'Homme et le réservoir ou la transmission interhumaine. Des mesures simples à mettre en œuvre pour éviter les risques d'infections venant du *Mastomys* consistent à stocker la nourriture dans des conteneurs hors de leur portée, éloigner les déchets des habitations et maintenir ces dernières propres de façon à éviter leur colonisation par les rongeurs. L'utilisation de moyen de dératisation et l'élimination des cadavres, via des sacs plastiques, permettent également d'éviter une possible infection. Afin d'éviter la contamination interhumaine, un diagnostic précoce de l'infection ainsi que l'isolement des patients sont nécessaires au sein des centres de soin. Il est également primordial que le personnel de soin en contact avec les pa-

tients suspects ou confirmés portent des éléments de protection individuels spécifiques des FHV [278].

V.3.b. Essais vaccinaux

Un nombre important de candidats vaccins ont été développés à partir des modèles animaux, notamment la souris, le cobaye et les PNH. Cependant aujourd'hui, aucun de ces vaccins candidats n'est parvenu en phase d'évaluation clinique chez l'Homme. De nombreuses stratégies ont été explorées pour élaborer un vaccin qui soit entièrement efficace contre l'infection au LASV. La grande majorité de ces études utilise des antigènes dérivés de la souche Josiah et analyse l'efficacité de la protection par l'inoculation chez l'animal de cette même souche. Ces essais vaccinaux sont détaillés ci-dessous et sont résumés dans le **Tableau 5**.

Les premiers essais vaccinaux immunisaient des PNH par l'injection du LASV entier inactivé par irradiation. Les animaux développaient une forte réponse anticorps contre la NP et GPC mais aucun d'entre eux ne survivaient à l'infection [291]. Ces résultats mettent en évidence la nécessité d'induire une réponse immunitaire cellulaire pour protéger de l'infection contre le LASV. Cependant, la grande majorité des études vaccinales analysent uniquement la production d'anticorps neutralisants, et non la capacité à induire une réponse cellulaire T cytotoxique. Les plateformes pour l'élaboration des candidats vaccins utilisent le virus MOPV [292], son virus réassortant MOPV/LASV (ML29) [217,293,294], des virus à ADN [295,296], des virus recombinants basés sur la fièvre jaune (17D) [297], VSV (rVSV) [212,298], la vaccine (rVACC) [292,299] et le virus de la rougeole (en cours de préparation).

Cobaye et souris. La première stratégie vaccinale a été mise au point par Cleg *et al.* dans les années 1980 et il s'agit du virus vivant de la vaccine exprimant la NP de LASV. Il parvenait à immuniser et à protéger 100% des cobayes infectés par LASV [299]. Plus tard, en 1987, un vaccin recombinant du VSV exprimant la GPC du LASV a été injecté chez une cohorte de cobaye au cours d'une étude par Safronetz *et al.* Après l'infection par la souche Josiah, les animaux n'ont pas montré de signes cliniques et ont survécu à la maladie [298]. En 2007, Carrión *et al.* ont montré que la vaccination par le ML29, possédant le segment L de MOPV et le segment S de LASV, chez le cobaye avait une bonne efficacité protectrice, protégeant 100% des animaux contre l'infection par les lignages II et IV de LASV [294]. Une étude récente, réalisé par Galan-Navarro *et al.* en 2017, a effectué un test vaccinal sur souris basé sur des nanoparticules de polymersomes sur lesquelles a été implanté la GP1 recombinante du LASV. Ces nanoparticules sont capables d'induire un chargement peptidique par le CMH-II intracellu-

laire. Les souris immunisées par ce vaccin ont montré une forte réponse humorale, notamment une forte production d'anticorps avec une forte affinité pour GP1 et un taux élevé de lymphocytes T-CD4 ainsi que des lymphocytes B sécréteurs d'IgG ^[300]. De nouvelles études d'Abreu-Mota *et al.* en 2018 ont montré que le vaccin du virus de la rage pouvait servir de vecteur pour un vaccin contre le LASV. Ce vaccin exprime une version codon-optimisé du gène GPC de LASV et permet une forte réponse humorale chez les modèles souris et cobaye ainsi qu'une protection ^[301].

Primate non humain. Bien que les données générées par les rongeurs soient importantes, le passage au singe est crucial. En effet, les réponses physiopathologiques et immunologiques développées chez les PNH ou chez les rongeurs sont différentes. Par conséquent, un vaccin qui fonctionne bien chez le modèle souris ou cobaye ne garantit pas une protection chez le primate. Ces derniers étant très proches de l'Homme, ils sont nécessaires pour qu'un vaccin candidat puisse être considéré comme un vaccin humain potentiel.

Le premier vaccin qui a permis d'immuniser de manière efficace le PNH a été le virus recombinant de la vaccine exprimant la GPC du LASV ^[292]. Dans cette étude réalisée par Fisher-Hoch *et al.* en 1989, des singes rhésus ont été immunisés par 10^9 PFU du virus vaccin et infectés 37 jours plus tard par 10^4 PFU du LASV Josiah par voie sous cutanée. Tous les animaux ont survécu à l'infection mais une virémie transitoire a été observée au bout de la première semaine post-infection et les animaux ont développé une légère fièvre et quelques perturbations cellulaires, notamment une lymphopénie, une neutrophilie et une baisse des fonctions plaquettaires. De plus, seulement 2 animaux sur 4 ont développé une réponse anticorps contre la GPC du LASV. Plus tard en 2000 le même laboratoire a mené une étude de protection plus large, utilisant une gamme de virus recombinants de la vaccine exprimant la NP, la GPC ou la combinaison des deux ^[211]. Les résultats ont montré que chez le PNH, une réponse dirigée contre la GP1 et la GP2 étaient requises pour protéger les animaux.

Une autre étude réalisée en 2015 par Safronetz *et al.* a testé l'efficacité d'un vaccin recombinant VSV exprimant la GPC du LASV. Les singes cynomolgus vaccinés par voie intramusculaire et par 2×10^7 PFU de ce candidat n'ont pas montré de signes cliniques, indiquant que le vaccin est bien toléré. A 28 jours post-immunisation, les animaux ont été infectés par 10^4 PFU du LASV Josiah. Aucun d'entre eux n'a développé de signes cliniques de la maladie et tous ont été entièrement protégés de l'infection létale ^[298]. De plus, aucune virémie n'a été détectée au cours de l'infection chez les animaux vaccinés. Ces résultats indiquent que le

rVSV/LVGPC est un candidat intéressant capable d'induire une forte réponse immunitaire, mais le nombre d'animaux utilisés au cours de l'étude (3 vaccinés et 1 contrôle) est trop faible et demande de plus amples investigations.

L'équipe de Cashman *et al.* a récemment développé un vaccin à ADN optimisé codant pour la GPC du LASV. Une injection intradermale par électroporation de 2.5 mg de cet ADN a permis de protéger 100% des PNH contre une infection fatale par LASV (une dose de LASV Josiah à 10^4 PFU par voie intramusculaire). Les singes vaccinés n'ont pas montré de signes cliniques et de virémie mesurable contrairement aux animaux contrôles non vaccinés. Des anticorps neutralisants ont été détectés chez les animaux vaccinés avec un pic 21 jours post infection [295].

Le virus de la fièvre jaune 17D a également été étudié en tant que vaccin vecteur pour l'expression d'antigènes du LASV par l'équipe de Lukashevich en 2012. Une dose unique de ce virus exprimant la GPC du LASV à une dose de 10^6 PFU a été inoculée chez le ouistiti 14 jours ou 30 jours avant le challenge des animaux par LASV Josiah à 10^3 PFU [302]. Cependant cette plateforme n'est pas parvenue à induire une réponse immunitaire protectrice et tous les animaux vaccinaux sont morts des signes cliniques de la FL. Ce vaccin avait pourtant permis de protéger 80% des cobayes infectés par LASV au cours d'une autre étude réalisée par Jiang *et al.* en 2011 [297], soulignant les différences qui sont souvent observées entre modèles animaux.

Enfin, plusieurs études utilisent la plateforme MOPV, proche de LASV mais non pathogène, pour l'élaboration d'un vaccin. MOPV partage les mêmes épitopes sur la NP et GP2 que LASV mais ne possède pas les mêmes épitopes sur la GP1, nécessaire pour éliciter une protection complète contre le LASV [292]. Néanmoins, au cours de l'étude testant l'efficacité du vaccin contre le LASV basé sur le virus recombinant de la vaccine, deux animaux ont été utilisés pour évaluer l'immunogénicité du MOPV sauvage. Les singes ont alors été immunisés par une injection sous cutanée de 10^4 PFU du MOPV avant de recevoir un challenge sous cutané de 10^4 PFU du LASV Josiah 37 jours plus tard. Les deux animaux vaccinés ont survécu à l'infection, ne développant que de très légers signes de la maladie. Cependant, ces singes ne produisaient aucun anticorps détectable contre la GP1 ou la GP2. Quelques années plus tard, un vaccin réassortant, le ML29, a été élaboré par l'équipe de Lukashevich dans l'optique de combiner le profil non pathogénique du MOPV et une forte protection immunologique dirigée contre le LASV. Ce clone possède le segment L de MOPV et le segment S du LASV

Josiah ^[217]. Ce virus vivant chimérique a la particularité d'être immunogène et efficace chez le ouistiti. En effet, l'inoculation sous cutanée d'une faible ou d'une forte dose du ML29 (10^3 PFU et 10^6 PFU respectivement) suivie 30 jours plus tard d'une injection sous cutanée du LASV Josiah (10^3 PFU) a induit une protection contre une infection létale du LASV chez 100% des animaux. Le vaccin a induit une faible virémie transitoire dans le plasma et une légère charge virale dans les tissus des animaux vaccinés. L'immunisation à forte dose a cependant augmenté le nombre de lymphocytes CD3+ et CD14+ circulants ainsi que l'expression des molécules du CMH-II et le recrutement des lymphocytes au niveau du parenchyme hépatique. 28 jours post immunisation, la quantité moyenne de cellules exprimant TNF- α chez les animaux immunisés par le ML29 à forte dose était sept fois plus importante que chez les animaux immunisés avec le ML29 à faible dose. Ces données indiquent que l'immunité induite par le ML29 est conférée par la réponse immunitaire adaptative cellulaire. Notre laboratoire a développé récemment un vaccin vivant atténué basé sur MOPV dans lequel le domaine exonucléasique de la NP a été muté, rendant le virus davantage immunogène. Une seule dose de ce vaccin administrée 37 jours avant l'infection a permis une protection complète de 4 singes cynomolgus contre une dose létale du virus LASV Josiah ^[216].

Enfin, notre laboratoire a également développé des candidats vaccins utilisant la plateforme du vaccin de la rougeole exprimant la GPC et la NP ou la GPC et la Z du LASV. Une seule dose 37 jours pré-challenge de l'un ou l'autre de ces candidats a permis la protection des singes cynomolgus infectés par une dose létale du virus LASV-Josiah (4 animaux dans chaque groupe). Ces animaux ont développé une forte réponse humorale et cellulaire à la suite du challenge (papier en soumission).

Malgré les nombreux vaccins candidats, aucun d'entre eux n'a abouti aux essais cliniques. Le cobaye est un animal utile pour une première évaluation des candidats vaccins mais des études plus approfondies utilisant le PNH sont nécessaires avant le passage aux essais cliniques. Les études non cliniques ont identifié un rôle des anticorps neutralisants mais surtout de l'immunité cellulaire dans la protection contre l'infection par LASV. Cependant, les différentes issues de la maladie observées chez les modèles animaux et les différentes stratégies suggèrent que l'identification précise du déterminant immunogénique du LASV n'est pas simple. Les réponses immunitaires cellulaires et humorales doivent être mesurées ensemble au cours des futurs essais cliniques.

Candidat vaccin	Espèce	Anti-gène/souche virale	Nbre de doses	Dose	Durée du challenge	Taux de survie	de paramètres testés	Date	Ref
Virus inactivé	Singe rhésus	Virus entier/?	6	?	108 j	0%	Anticorps	1992	291
Vaccin (rVACC)	Cobaye Hartley	NP/LASV-GA391	1	10 ⁷ PFU	28 j	100%	?	1987	299
	Singe rhésus	GPC/?	1	10 ⁹ PFU	28-37 j	100%	Anticorps	1989	292
	Singe rhésus + cynomolgus	GPC et GPC+NP/LASV-Josiah	1 ou 2	10 ⁹ PFU	62-488 j	89% GPC 90% GPC/NP	Anticorps	2000	211
rVSV	Cobaye souche 13	GPC/LASV-Josiah	1	10 ⁶ PFU	28 j	100%	Anticorps	2015	298
	Singe cynomolgus	GPC/LASV-Josiah	1	2. 10 ⁷ PFU	28 j	100%	Anticorps et IFN γ	2015	298
rMOPV/LASV (ML29)	Cobaye souche 13	GPC+NP/LASV-Josiah	1	10 ³ PFU	30 j	100%	Anticorps	2007	294
	Singe ouistiti	GPC+NP/LASV-Josiah	1	10 ³ PFU	30 j	100%	Anticorps	2008	217
Nanoparticules avec rGP1	Souris C57BL6	GP1/?	2	10 μ g	14 et 28 j	0%	Anticorps et réponse T/B	2017	300
Vaccin ADN	Singe cynomolgus	GPC/LASV-Josiah	2	2,5 mg	28 j	100%	Anticorps	2017	295
Virus de la fièvre jaune 17D	Singe ouistiti	GPC/LASV-Josiah	2	?	14 ou 30 j	0%	?	2012	303
MOPV	Singe rhésus	Virus entier/?	1	10 ⁴ PFU	37 j	100%	Anticorps	1989	292
	Singe cynomolgus	Virus entier/MOPV-AN	1	6.10 ⁶ PFU	37 j	100%	Anticorps et réponse T	2008	216
Vaccin du virus de la rougeole	Singe cynomolgus	GPC+NP/LASV-Josiah	1	2.10 ⁶ TCID	37 j	100%	Anticorps Réponse T	2018	En cours
	Singe cynomolgus	GPC+Z/LASV-Josiah	1	50	37 j	100%	Transcriptome		

Tableau 5. Récapitulatif des principales plateformes vaccinales contre le LASV.

Problématique & Objectifs

Parmi les maladies émergentes, les FHV représentent un problème de santé publique important à travers le monde, en particulier en Afrique. La précédente épidémie de maladie à virus Ebola qui a sévit en Afrique de l'Ouest est un exemple de la menace que représentent ces maladies. Parmi les FHV, la FL est probablement l'une des plus inquiétantes en raison de sa forte morbidité et de sa forte mortalité. Cette maladie endémique s'étend sur une large région géographique en Afrique de l'Ouest, allant de la Guinée jusqu'au Nigéria, et des études de terrain montrent que la FL a tendance à circuler dans des régions où elle n'était pas présente autrefois. De plus, il n'existe pas de traitements réellement efficace ni de vaccins disponibles contre cette maladie. Par conséquent, seuls les outils de diagnostic permettent actuellement de restreindre les épidémies en permettant l'isolement des patients et la protection des agents de santé. Il est important de noter que la FL est une maladie négligée. En effet elle frappe des pays en voie de développement avec des structures sanitaires limitées et une instabilité politique et sociale. Les industries pharmaceutiques ne montrent ainsi pas d'intérêt pour cette maladie car les pays touchés ne sont pas solvables. De plus, l'accès aux patients sur le terrain est difficile et la manipulation du LASV nécessite un confinement de niveau 4. Toutes ces raisons font que peu d'équipes dans le monde s'intéressent à la FL. Par conséquent, la physiopathogénèse et les réponses immunitaires associées à la FL, et en particulier aux différentes issues de la maladie qui vont de la forme asymptomatique à la fièvre hémorragique fatale, ne sont pas connues.

Grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*, notre laboratoire et d'autres équipes avons pu montrer que les DC et les macrophages étaient des cibles précoces du LASV au cours de l'infection ^[145]. Ces cellules permettent la réplication du virus mais ne sont pas activées et ne produisent pas d'IFN-I. L'IFN-I joue un rôle important dans la défense antivirale et dans la mise en place de l'immunité adaptative. Ainsi, l'absence de réponse des CPA infectées par le LASV peut être responsable de l'absence de réponse immunitaire adaptative et de la progression de la pathogénèse. Nous avons confirmé cette hypothèse par le développement d'un système de coculture *in vitro* DC – cellules T dans lequel les DC infectées par le LASV ne parviennent pas à induire une réponse robuste des cellules T-CD4+ et T-CD8+ ^[261]. Au contraire, les cellules T sont fortement activées, prolifèrent et acquièrent une réponse cytotoxique robuste lorsqu'elles sont en contact avec des DC infectées par le MOPV, un Arénavirus immu-

nogène et non pathogène très proche de LASV. Le LASV est donc faiblement immunogène et n'induit pas de réponses immunitaires T efficaces et peut même avoir des effets immunosuppresseurs, ce qui est cohérent avec sa forte pathogénicité. Grâce à l'utilisation de modèles *in vitro*, nous avons pu identifier, avec d'autres équipes, certains facteurs viraux impliqués dans la pathogénicité. Un LASV recombinant arborant deux mutations dans le gène de la NP, empêchant ainsi l'inhibition de la synthèse d'IFN-I, a été généré. Ce virus s'est révélé être fortement atténué et immunogénique, induisant une forte réponse IFN-I par les CPA infectées ^[99].

Malgré les avancées importantes qui ont été faites ces dernières années dans la compréhension des interactions virus-hôte grâce aux modèles *in vitro*, la connaissance de la pathogenèse de la FL reste très parcellaire. Les infections sévères par le LASV semblent être associées à une forte virémie et à une immunosuppression chez les patients. Des changements anatomopathologiques, notamment une déplétion des tissus lymphoïdes, une nécrose de la zone marginale splénique et une lymphopénie transitoire ont été décrits chez les patients. Les études de la FL chez ces derniers sont freinées par la nécessité de structures de haute sécurité, non disponibles sur le terrain, et l'accès limité aux patients dans les pays endémiques. Bien que les données *in vitro* aient permis une avancée considérable sur la compréhension de la FL, elles ne permettent pas de comprendre la physiopathogenèse et les réponses immunes développées par un organisme complet et complexe comme c'est le cas lors de l'utilisation d'un modèle animal. Les modèles rongeurs utilisés au cours de l'infection par le LASV sont pratiques pour le criblage de traitements ou de vaccins mais ils ne reproduisent pas complètement la pathogenèse et les réponses immunes développées au cours de la FL humaine. Seul le PNH se révèle être un modèle pertinent pour étudier la FL car il reproduit de manière fidèle les réponses observées chez l'Homme. Cependant, la grande majorité des études réalisées chez le primate induit une forme fatale de la maladie qui n'illustre donc pas l'importante variabilité des symptômes et de sévérité de la maladie observée chez les patients.

Un nombre très limité d'études s'est intéressé à la comparaison de la pathogenèse et des réponses développées parmi les individus qui contrôlent et survivent à l'infection et ceux qui décèdent. Au cours d'une étude pilote, notre laboratoire a développé un modèle de FL chez le singe cynomolgus dans lequel deux des trois animaux infectés par voie sous cutanée avec une dose de 1000 PFU de la souche AV du LASV ont survécu, permettant une première détermination des facteurs pathologiques impliqués au cours de la maladie sévère ou dans le contrôle de l'infection. Il a été observé chez tous les animaux une lymphopénie et une thrombocytopénie transitoire, une splénomégalie et des changements pathologiques au niveau du foie et des

poumons. Les animaux survivants présentaient moins de lésions et une charge virale plus faible que les animaux morts. Une synthèse non contrôlée d'IL-6 a été retrouvée uniquement dans le plasma des animaux morts. Les survivants présentaient une augmentation du nombre de monocytes circulant ainsi que de lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ activés, tandis que cette activation était faible et retardée chez les animaux décédés ^[204]. Ces résultats semblent indiquer qu'une forte réponse immunitaire semble liée au contrôle de la réplication virale et à la survie tandis que les infections fatales sont caractérisées par une faible réponse immunitaire et une réplication virale non contrôlée. De plus, les résultats semblent montrer que l'issue de la maladie est déterminée rapidement après l'infection et probablement avant l'arrivée des symptômes, mais de plus amples investigations sont nécessaires.

L'étude présentée ici se propose de développer davantage notre modèle de FL chez le singe cynomolgus précédemment mis au point par notre laboratoire, et de caractériser et comparer la pathogenèse de la maladie en fonction de sa sévérité.

Les objectifs de cette étude sont :

1. Etudier les changements cliniques, biologiques et hématologiques associés aux issues fatales et non fatales pour identifier des marqueurs biologiques d'infection qui soient les plus précoces possible et prédictifs de l'issue de la maladie.
2. Déterminer de manière précise le tropisme et la dynamique virale au cours de l'infection et les comparer entre les différentes issues de la maladie. Il sera alors possible d'identifier les compartiments impliqués dans les premiers cycles de réplication du LASV et d'établir une cinétique de réplication du virus dans les différents tissus, et ce, tout au long de la maladie.
3. Caractériser les mécanismes anatomopathologiques menant au syndrome hémorragique et au choc terminal afin de mieux comprendre la physiopathogenèse de la FL.
4. Etudier les réponses immunitaires associées à la guérison ou à l'issue fatale afin d'identifier les mécanismes protecteurs ou au contraire immunopathologiques.

Nous avons infecté, au cours d'une première expérimentation, une cohorte d'animaux avec la souche AV, selon les mêmes modalités que lors de l'étude pilote. Cependant, tous les animaux ont survécu. L'infection au cours de la deuxième expérimentation d'une autre cohorte d'animaux avec la souche Josiah, fortement létale chez le primate, nous a permis d'obtenir 100% de mortalité. Enfin et au cours de la troisième expérimentation, nous avons infecté plusieurs groupes d'animaux avec la souche AV ou Josiah avant de procéder à leur euthanasie à

différentes phases de la maladie (J2, J5 et J11 post infection). Nous avons ainsi eu accès aux fluides et aux organes des animaux tout au long de la maladie allant des phases précoces d'incubation en passant par le pic de la maladie et jusqu'à la phase terminale, caractérisée en fonction de l'issue de la maladie soit par une guérison progressive, soit par une réplication virale non contrôlée et la mort des animaux. Grâce à ce modèle, nous avons caractérisé plus en détails les événements pathogéniques et les réponses de l'hôte impliquées dans la survie ou dans la mort suite à l'infection par le LASV, en mettant l'accent sur les phases précoces de la maladie. Le tropisme viral, les mécanismes physiopathologiques et les réponses immunitaires innées et adaptatives ont été étudiées au cours de l'infection et comparées entre les deux issues de la maladie. En résumé, nous avons mis au point un modèle de FL chez le singe cynomolgus permettant d'étudier la progression de la pathogenèse au cours des formes fatales et non fatales de FL. Ce modèle permettra des avancées dans la compréhension des mécanismes pathogéniques et des réponses immunitaires associées aux formes sévères ou non sévères de la FL ainsi que l'identification de marqueurs précoces d'infection, prédictifs de l'issue de la maladie.

Résultats

I. Présentation du modèle expérimental de FL chez le singe cynomolgus et observations cliniques

Un total de 28 singes cynomolgus a été utilisé au cours de ce projet. En raison de la capacité limitée de l'animalerie A4, trois séries d'expérimentations ont été faites avec un intervalle de temps d'environ un an entre chaque série. Les deux premières séries d'expérimentations ont été basées sur le suivi des animaux contrôles et des animaux infectés par les deux souches du LASV : AV et Josiah, avec une limite de temps fixée à 28 jours. Des prélèvements de sang et

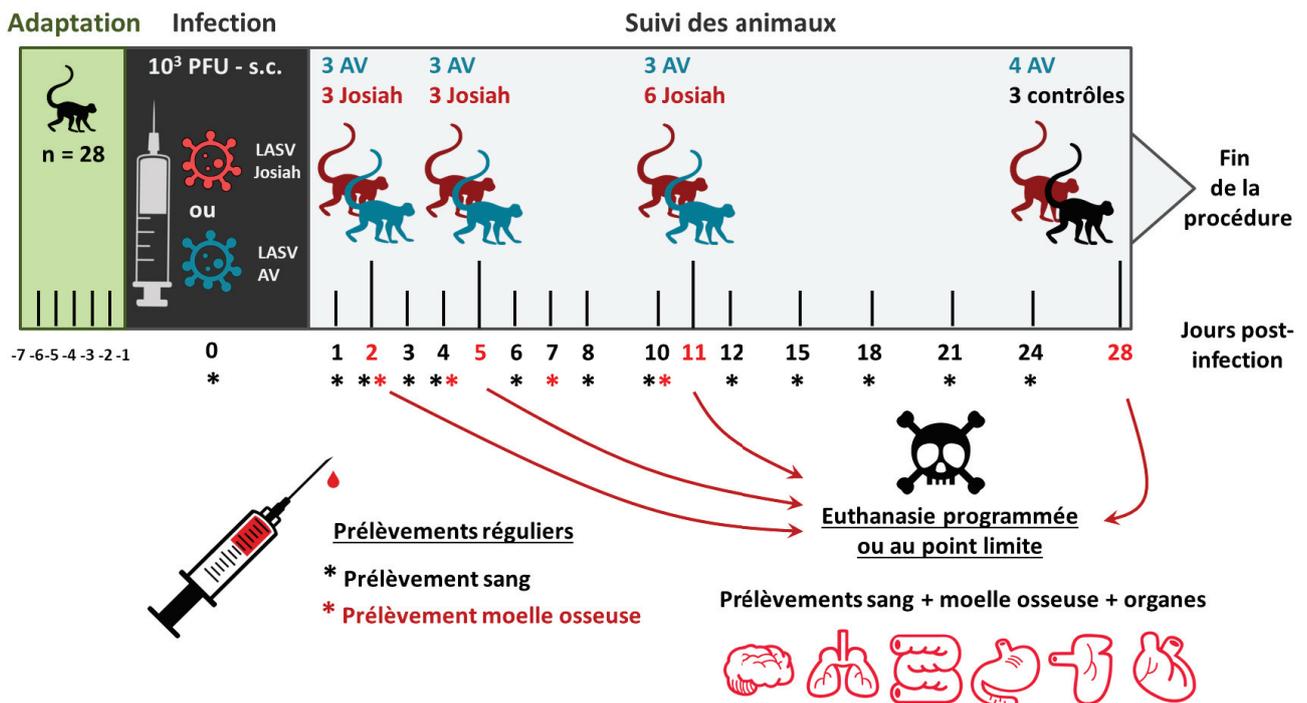


Figure 26 : Déroulement des expérimentations sur primates. Les 28 singes utilisés au cours de 3 expérimentations animales ont été acclimatés à leur nouvel habitat pendant une semaine avant le jour d'infection. 6 animaux infectés par LASV-Josiah, 4 animaux infectés par LASV-AV et 3 animaux contrôles non infectés ont été suivis tout au long de la maladie jusqu'à 28 jours post infection. Du sang et de la moelle osseuse ont été prélevés régulièrement au cours de l'infection et les organes ont été récoltés à la suite des euthanasies. En parallèle des études de suivi, 15 animaux ont été infectés par LASV-Josiah ou LASV-AV puis euthanasiés à J2, J5 ou J11 post infection afin d'obtenir l'accès aux organes à différentes phases de la maladie. En résumé, nous avons accès aux échantillons de sang, de moelle osseuse ainsi qu'aux prélèvements d'organes chez les singes AV et les singes Josiah tout au long de la FL, comprenant les phases précoces d'incubation, le pic de la maladie et la guérison.

de moelle osseuse ont été régulièrement effectués. La troisième expérimentation s'est intéressée plus en détail aux changements anatomopathologiques et immunologiques dans les organes au cours de la maladie grâce à l'euthanasie séquentielle et programmée des animaux infectés par les deux souches du LASV. Les euthanasies ont été programmées à J2 post infection, correspondant à une période très précoce après l'infection ; à J5 post infection, correspondant à la fin de la phase d'incubation et la survenue des symptômes ; ainsi qu'à J11 post infection, correspondant au pic de la phase aiguë de la maladie. Un schéma récapitulatif est présenté en **Figure 26**. Pour résumer, il nous a été possible d'étudier la progression de la FL pendant toute la phase symptomatique chez 10 animaux et nous avons obtenu les organes et les échantillons de 15 animaux pendant la phase d'incubation (2 et 5 jours post infection) et au pic de la maladie (11 jours post infection). Nous avons également eu accès aux valeurs contrôles des animaux grâce aux échantillons de trois animaux non infectés.

Le **Tableau 6** ci-dessous informe sur les différentes cohortes utilisées au cours des expérimentations. Parmi les 28 singes utilisés au total, 13 singes ont été suivi tout au long de la maladie. Parmi ces 13 singes, 4 ont été infectés par la souche LASV-AV à 1000 FFU, 6 par la souche LASV-Josiah à 1000 FFU et 3 n'ont pas été infectés. Il a été observé une forte hétérogénéité au niveau des signes cliniques développés au sein des animaux infectés par la souche LASV-AV. En effet, un animal de cette cohorte n'a développé aucun signe d'infection tandis qu'il a été observé chez les trois autres une asthénie et une dépression plus ou moins marquées au bout de 5 jours d'infection. Ces signes cliniques ont également été observés chez les animaux infectés par LASV-Josiah, mais de manière plus marquée et progressive. Certains signes sporadiques, observés dans les deux cohortes, comprenant des diarrhées de faible intensité et des érythèmes dans la région inguinale, ont été notés au cours du suivi mais ils ne semblent pas être spécifiques de la FL développée par le primate. Des signes plus spécifiques comme l'apparition transitoire de pétéchies cutanées ont été observés chez les singes infectés par LASV-Josiah au cours des premiers jours de l'infection. De manière intéressante, nous n'avons pas mesuré d'hyperthermie chez les animaux infectés par LASV-AV tandis que celle-ci est survenue dès J4 post infection chez les animaux infectés par LASV Josiah (**Figure 27.A et B**). La fièvre a augmenté progressivement jusqu'à atteindre un pic aux alentours de J8 post infection suivie d'une brutale hypothermie précédant les phases terminales de la maladie, c'est-à-dire avant l'euthanasie des animaux suite au dépassement du point limite de souffrance. Les données de température des puces Anipill (sondes électroniques implantées par voie intrapéritonéale et mesurant la température toute les 15 minutes), ont donné des résultats plus précis

sur l'ensemble du suivi (**Figure 27.C**) chez les animaux infectés par LASV-Josiah. En effet, ces puces permettent de capturer les températures de manière très régulière lorsque les animaux sont vigiles, permettant l'obtention de données de température plus justes que la prise de température rectale manuelle, au moment où les animaux sont endormis. Nous avons observé chez ces animaux une oscillation périodique de la température en fonction du cycle jour/nuit des animaux. Tandis que les températures n'ont pas montré de variation chez les deux animaux contrôles au cours de la durée de l'expérimentation, nous avons observé chez les animaux infectés par LASV-Josiah une augmentation importante de celle-ci dès J3 post infection et une hypothermie précédant la mort, avec une oscillation comprise entre 42°C (pic de la fièvre) et 36°C (phase terminale). Ces résultats confirment l'hyperthermie observée avec la prise manuelle de température rectale. Les puces Anipill n'étaient pas disponibles auprès du fournisseur au cours de la première expérimentation et n'ont pas fonctionné chez les animaux infectés par LASV-AV puis euthanasiés à J11 post infection au cours de la troisième expérimentation. Nous n'avons donc pas pu avoir de mesures précises et continues des températures pour les animaux infectés par LASV-AV. Les signes cliniques fréquemment observés chez tous les animaux malades se sont résumés à une anorexie et une déshydratation. Les animaux infectés par LASV-AV ont perdu approximativement 10% de leur poids initial au bout de 15 jours d'infection, avant que celui-ci ne se stabilise jusqu'à la fin de l'expérience (**Figure 27.D-E**). Cette perte de poids a été plus marquée chez les singes infectés par LASV-Josiah, particulièrement au cours des phases terminales (entre J10 et J12 post infection). Cette phase terminale a été observée uniquement chez les singes infectés par LASV-Josiah. Elle a été caractérisée par une asthénie très sévère et des difficultés respiratoires chez tous les animaux ainsi que l'irruption de saignements nasaux chez deux d'entre eux. La totalité de la cohorte a été euthanasiée suite au dépassement du score clinique défini comme point limite. Plusieurs paramètres définissent ce score clinique, notamment la température, l'hydratation, la prise d'alimentation, l'état général, etc. L'atteinte plus ou moins sévère de ces paramètres a entraîné une augmentation du score clinique global pour un animal. La limite de souffrance, établie par une valeur seuil du score clinique fixée à 15, nous a conduit à l'euthanasie des animaux (C.f. section II du matériel et méthodes pour plus de précisions). Les euthanasies ont eu lieu entre J11 et J15 post infection pour les animaux infectés par LASV-Josiah (**Figure 27.F**). Pour plus de lisibilité dans la suite des résultats, les données biologiques des animaux obtenues le jour de la mise à mort ont été rassemblées et établies à J12 post infection. Au cours de nos expérimentations, la souche LASV-Josiah a été létale à 100% chez les animaux infectés alors que la cohorte infectée par LASV-AV a entièrement survécu (**Figure 27.G**).

Cohorte	N° expéri- mentation	Identifica- tion	Virus et dose	Sexe	Age (années)	Poids (kg)
Contrôles	1 (10/2015) + 2 (01/2017)	BA714L	PBS	M	3	4
		CCJ059	PBS	M	3	4
		CCJ034	PBS	M	3	3.6
LASV-AV (suivi)	1 (10/2015)	BA496M	AV-1000 FFU	M	3	4.8
		BA910K	AV-1000 FFU	M	3	4.6
		BB205I	AV-1000 FFU	M	3	4.5
		CA571F	AV-1000 FFU	M	3	4.3
LASV-Josiah (suivi)	2 (01/2017)	CCK053	Josiah-1000 FFU	M	3	3.6
		CCK010	Josiah-1000 FFU	M	3	3.7
		CCL011	Josiah-1000 FFU	M	3	3.6
		CCL020	Josiah-1000 FFU	M	3	3.6
		CDA078	Josiah-1000 FFU	M	3	3.8
		CDC022	Josiah-1000 FFU	M	3	4
LASV-AV (J2)	1 (10/2015)	BB332H	AV-1000 FFU	M	3	4.5
		BB484F	AV-1000 FFU	M	3	4.6
		BB812F	AV-1000 FFU	M	3	4
LASV-Josiah (J2)	3 (04/2018)	CFB022	Josiah-1000 FFU	F	2	2.2
		CEL092	Josiah-1000 FFU	F	2	2.5
		CFB094	Josiah-1000 FFU	F	2	2.3
LASV-Josiah (J5)	3 (04/2018)	CEK057	Josiah-1000 FFU	F	2	2.2
		CEK006	Josiah-1000 FFU	F	2	2.4
		CEL060	Josiah-1000 FFU	F	2	2.4
LASV-AV (J5)	3 (04/2018)	CFB024	AV-1000 FFU	F	2	2.5
		CFB035	AV-1000 FFU	F	2	2.6
		CFB027	AV-1000 FFU	F	2	2.6
LASV-AV (J11)	3 (04/2018)	CEL083	AV-1000 FFU	F	2	2.6
		CFB061	AV-1000 FFU	F	2	2.2
		CFB028	AV-1000 FFU	F	2	2.4

Tableau 6 : Récapitulatif des cohortes utilisées au cours de l'étude.

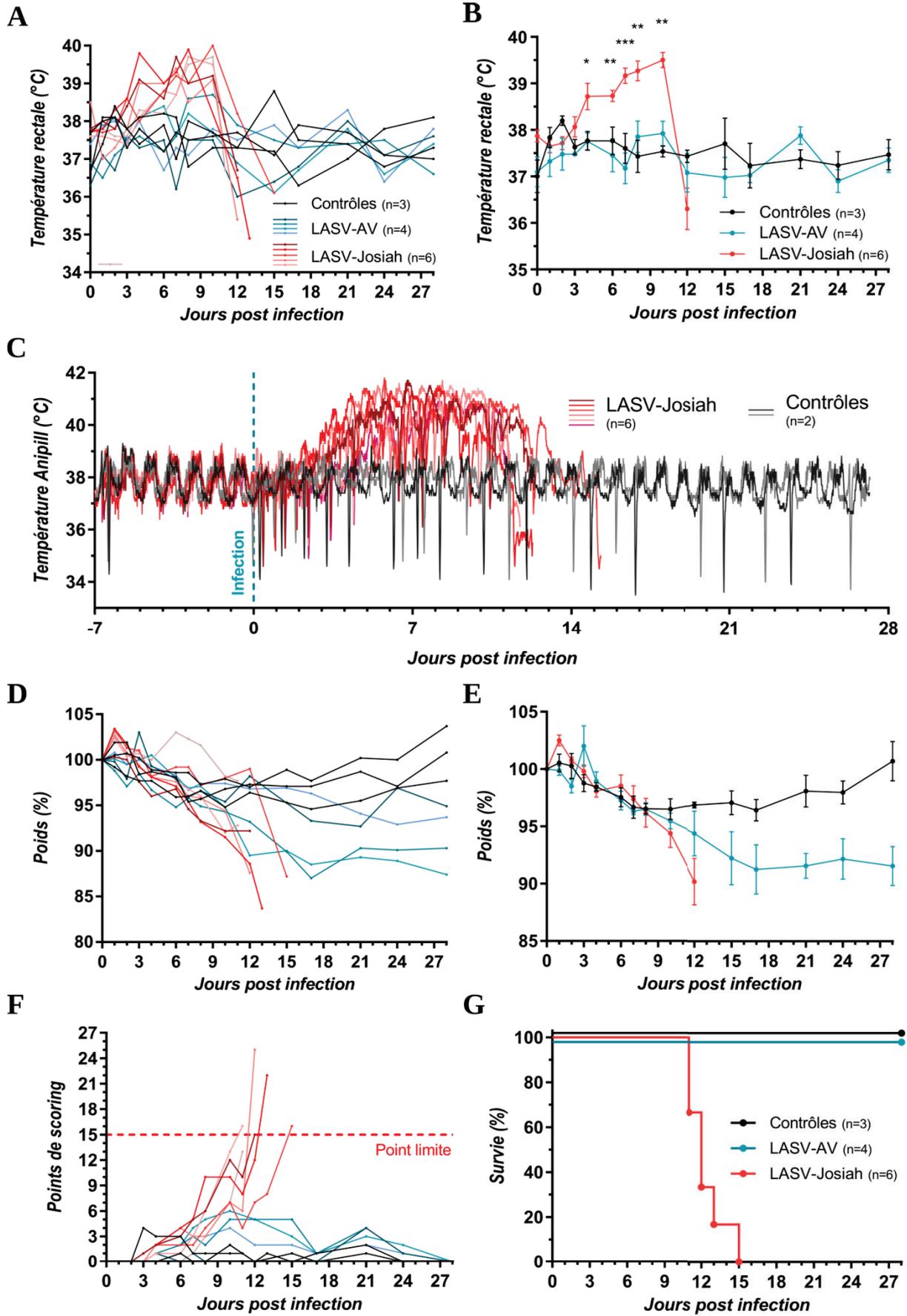


Figure 27 : Signes cliniques et résultats expérimentaux. A) Les animaux ont été anesthésiés chaque jour de prélèvements et la température rectale a été prise manuellement. Les résultats ont été renseignés individuellement en (A) ou par moyenne au sein des différentes cohortes en (B). Un test de Student a été appliqué pour la comparaison des moyennes entre les singes survivants et les singes morts (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (C) Les animaux de l'expérimentation n°2 ont été implantés avec une puce électronique intrapéritonéale mesurant la température toutes les 15 minutes et envoyant les données à un moniteur externe dont les données ont été extraites et traitées individuellement. (D) Les animaux ont été anesthésiés puis pesés à l'aide d'une balance. Les résultats ont été renseignés individuellement en (D) ou par moyenne au sein des différentes cohortes en (E). (F) Les animaux ont été suivis périodiquement au niveau de leur allure générale et de leurs signes cliniques. Chaque événement clinique a entraîné l'élévation du score, préalablement établi par un comité d'éthique, proportionnelle à l'intensité et/ou le nombre de ces événements. L'euthanasie a été effectuée systématiquement lorsque le score des animaux dépassait 15. (G). Taux de survie des singes cynomolgus infectés par les souches LASV-AV ou LASV-Josiah.

En résumé, nous avons établi un modèle de FL chez le primate dans lequel nous obtenons, via l'utilisation d'une dose et d'une voie d'injection identiques, 100% de survie avec la souche LASV-AV et 100% de létalité avec la souche LASV-Josiah. L'inoculation de l'une ou l'autre de ces souches virales entraîne le développement d'une importante variabilité de signes cliniques, allant d'une forme quasi asymptomatique de la maladie à une forme fatale, au même titre de ce qui est observé au cours des FL humaines.

II. Altérations cliniques et hématologiques au cours de la FL

De nombreux analytes ont été mesurés au cours de la maladie développée par notre modèle animal. Nous avons enregistré une augmentation de la protéine C réactive (CRP) dès 6 jours post infection chez les singes infectés par LASV-Josiah (morts) tandis que l'augmentation n'a été observée que 10 jours après l'infection chez les singes infectés par LASV-AV (survivants) (**Figure 28.A**). Ce marqueur, témoin d'une réaction inflammatoire, a augmenté très rapidement chez les cas fatals jusqu'à atteindre un pic au cours de la phase terminale, tandis que la hausse était plus modérée et a diminué à J12 post infection chez les animaux contrôlant l'infection. De manière intéressante, les marqueurs de lésions rénales, notamment la créatinine et l'urée, ont vu leurs concentrations fortement augmenter uniquement dans le plasma des cas fatals. La concentration en créatinine a augmenté dès J6 post infection et celle de l'urée uniquement au cours de la phase terminale à J10 post infection (**Figure 28.B-C**). Ces mêmes marqueurs n'ont pas montré de variations marquées chez les animaux survivants ou chez les animaux contrôles. Nous avons également noté une augmentation des concentrations des transaminases AST et ALT, particulièrement prononcée chez les animaux ayant succombé

à l'infection (**Figure 28.D-E**). Alors que cette hausse est modérée et transitoire chez les animaux survivants, celle-ci est apparue plus rapidement et a augmenté drastiquement jusqu'à la mort des animaux au cours de l'issue fatale. La concentration en albumine (ALB) a également fortement diminué chez les animaux infectés par rapport aux animaux contrôles, quelle que soit l'issue de la maladie (**Figure 28.F**). Ces résultats indiquent que la FL a induit des lésions hépatiques chez notre modèle, et que les altérations sont plus importantes au cours des cas sévères de la maladie. Il a également été observé chez les animaux infectés une augmentation de la concentration en lactate déshydrogénase (LDH), un marqueur de lésions tissulaires générales. Une fois encore, la hausse de la LDH est transitoire et modérée chez les survivants alors qu'elle augmente drastiquement et de manière plus précoce chez les animaux morts de la maladie (**Figure 28.G**). Nous avons noté une augmentation de la concentration en créatine phosphokinase (CPK) et en amylase sanguine uniquement au cours de la phase terminale chez les animaux ayant succombé à l'infection (**Figure 28.H-I**). Ces marqueurs sont les témoins respectifs de pathologies principalement musculaires et hépatiques. Enfin, nous avons observé un déséquilibre ionique uniquement dans le plasma des animaux atteints d'une FL sévère, caractérisé par une baisse de la concentration des ions sodiums (Na^+) et chlorure (Cl^-) ainsi que du calcium ionisé (iCa) (**Figure 28.J-K-L**).

L'analyse de l'hémostase a montré une augmentation significative du taux de céphaline activée (APTT), mais pas du temps de prothrombine (PT), et ce, uniquement dans le plasma au cours des cas sévères de FL (**Figure 29.A-B**). Cette hausse de l'APTT apparaît six jours après l'infection et est maintenue jusqu'à la mort des animaux. Nous n'avons pas observé de hausse significative du taux de fibrinogène, quelle que soit l'issue de la maladie. Le temps de thrombine (TT) a montré une élévation significative à partir de J8 post infection chez les animaux fatalement infectés (**Figure 29.C-D**). En revanche, nous n'avons pas noté d'augmentation de produits de dégradation de la fibrine (D-dimères), témoignant de l'absence de CIVD chez les singes infectés par LASV. Enfin, il a été observé une légère thrombocytopénie chez tous les animaux infectés, peu importe l'issue de la maladie. Le nombre de plaquettes est remonté à une valeur contrôle au bout de 15 jours d'infection chez les animaux contrôlant la maladie (**Figure 29.E**). Il semble donc que les cas sévères de FL dans notre modèle soient caractérisés par des troubles de l'hémostase.

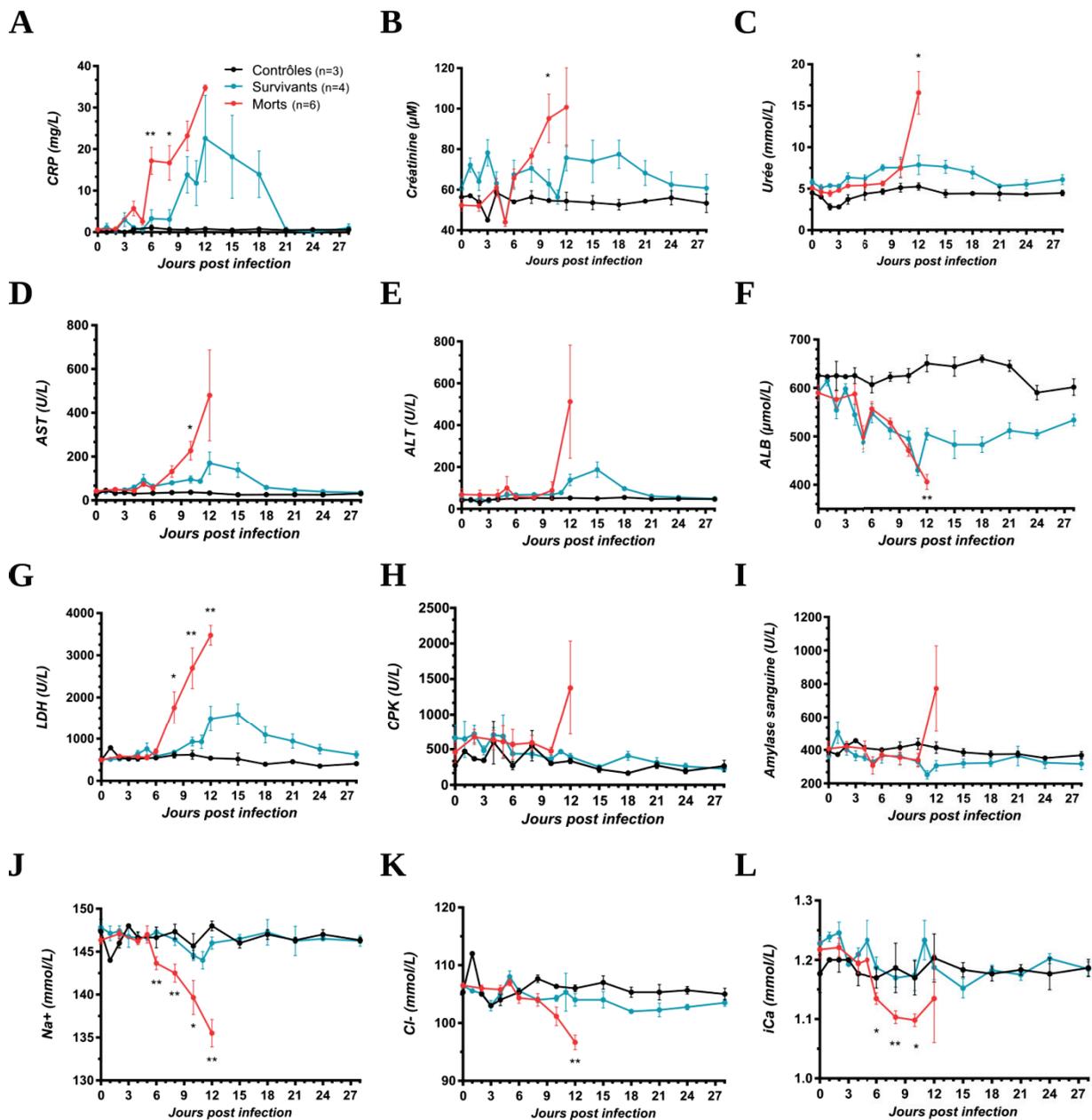


Figure 28 : Altérations biochimiques au cours de la FL. (A-L) Les concentrations en protéine C réactive (CRP), créatinine, urée, AST, ALT, albumine (ALB), lactate déshydrogénase (LDH), créatine kinase (CPK), amylase, ions sodium (Na⁺), ions chlorure (Cl⁻) et en calcium ionisé (iCa) ont été mesurées dans le plasma des animaux infectés et des animaux contrôles après anesthésie. Les statistiques présentées correspondent à un test de Student entre les singes morts de l'infection et les singes survivants. (* p<0.05 ; ** p<0.01).

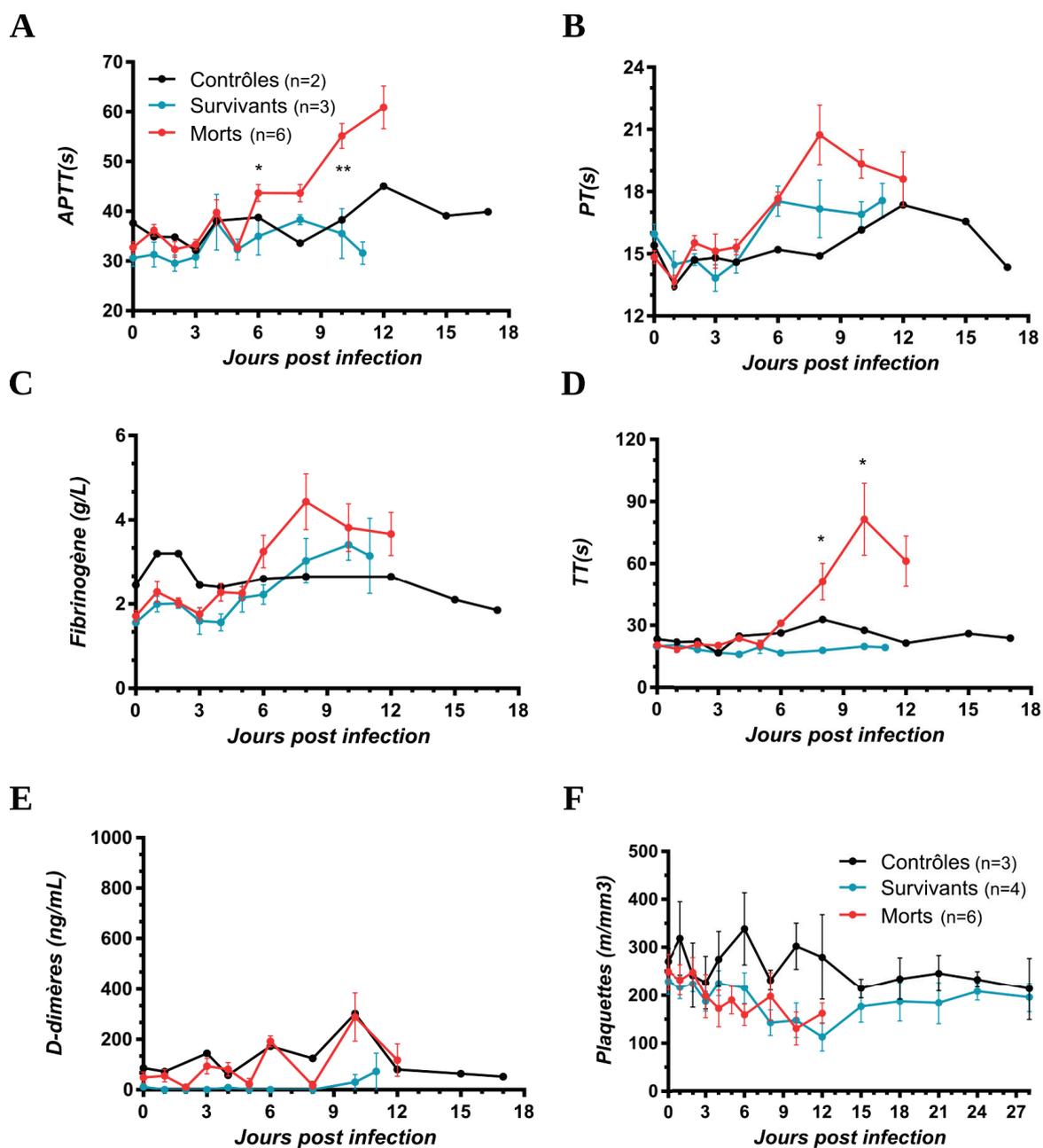


Figure 29 : Altérations des paramètres de coagulation au cours de la FL. Le taux de céphaline activée (A), de prothrombine (B), de fibrinogène (C), le temps de thrombine (D) et la concentration en D-dimères (E) ont été mesurés dans le plasma des animaux infectés et des animaux contrôles après anesthésie. (F) Le nombre de plaquettes a été calculé au cours de l'infection à partir du sang des animaux infectés. Les statistiques présentées correspondent à un *t*-test entre les animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la maladie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

En résumé, de nombreux paramètres biochimiques et hématologiques sont perturbés au cours de la FL, et certains semblent être spécifiques de l'issue de la maladie. Des perturbations des marqueurs généraux de lésions tissulaires et hépatiques sont retrouvées au cours des deux issues, mais celles-ci sont plus importantes au cours de l'issue fatale. De manière intéressante, la sécrétion dérégulée de marqueurs de lésions rénales (créatinine et urée) n'a été identifiée qu'au cours de l'issue fatale, pouvant ainsi constituer un marqueur prédictif de la maladie. Un déséquilibre électrostatique, qui concerne les ions sodium, chlorure et calcium, est retrouvé uniquement chez les animaux qui succombent à l'infection. On observe également chez ces derniers des troubles de la coagulation dès 6 jours post infection mais pas au cours des FL peu sévères. Ces troubles sont également accompagnés par une légère thrombocytopénie affectant tous les animaux infectés, quelle que soit la sévérité de la maladie.

III. Dynamique de la réplication virale au cours de la FL

La dynamique virale au cours de la FL ainsi que les cellules cibles du virus *in vivo* ne sont pas connues. Nous allons étudier dans cette partie l'évolution de la dynamique et du tropisme viral dans le sang et la moelle osseuse tout au long de l'infection ainsi que dans les différents organes à des temps séquentiels (J2, J5, J11 et J28 post infection), et ce, entre les animaux infectés par une souche létale du LASV (souche Josiah) et ceux infectés par la souche AV, menant à une infection non létale. L'évolution du tropisme viral sera étudiée parallèlement avec les changements anatomopathologiques observés au cours des analyses histologiques.

III.1. Virémie dans le sang et la moelle osseuse

La virémie a été suivie chez les animaux infectés à l'aide de deux méthodes : la quantification de l'ARN viral et le titrage viral par quantification des foyers infectieux. La présence d'ARN viral a été détectée dans le plasma de la quasi-totalité des singes dès J3 et J4 post infection (**Figure 30.A**). Chez les singes survivants, la quantité d'ARN viral a augmenté jusqu'à atteindre un pic à partir de J8 post infection. Le nombre de copies a ensuite diminué entre J10 et J18 post infection en fonction des individus, jusqu'à ne plus être détectable. La quantité d'ARN viral a augmenté plus rapidement et de manière plus importante chez les animaux qui ont succombé à la maladie, atteignant un pic à environ $5 \cdot 10^8$ copies/mL chez tous les sujets au cours de la phase terminale, à J12 post infection. A cette période, nous avons dénombré en moyenne 500 fois plus de quantité d'ARN viral chez les animaux ayant développé une issue fatale par rapport aux animaux survivants (c.f. panel de droite correspondant aux moyennes). De manière intéressante, des particules virales infectieuses ont été détectées plus précocement dans le plasma sanguin de tous les animaux morts de la maladie, dès 6 jours post infection, comparé aux animaux survivants dont un titre positif n'a été détecté qu'à J8 post infection et pour seulement une partie d'entre eux (**Figure 30.B**). Le titre infectieux a ensuite fortement augmenté chez les animaux morts jusqu'à atteindre un pic à une moyenne de 10^6 FFU/mL au cours de la phase terminale (c.f. panel de droite correspondant aux moyennes). Les animaux survivants ont vu leur titre viral plasmatique augmenter de manière plus modérée, puis atteindre un pic 12 jours après l'infection avant de diminuer jusqu'à devenir indétectable, trois semaines après l'infection. La quantité de particules infectieuses détectées au pic de la maladie, c'est-à-dire J12 post infection, était 1000 fois plus importante chez les animaux morts de la maladie par rapport aux animaux survivants. Enfin, nous nous sommes intéressés à la proportion

de particules défectives en calculant le ratio entre la quantité d'ARN et le nombre de particules infectieuses dans le plasma sanguin des animaux. Ce ratio est élevé chez les animaux infectés par LASV Josiah (1000) et tend à diminuer au cours de l'infection jusqu'à la phase terminale où ce ratio atteint 100 pour la plupart des animaux. Ce ratio est plus bas chez trois des quatre animaux infectés par LASV AV (100) et n'a pas semblé varier au cours de l'infection.

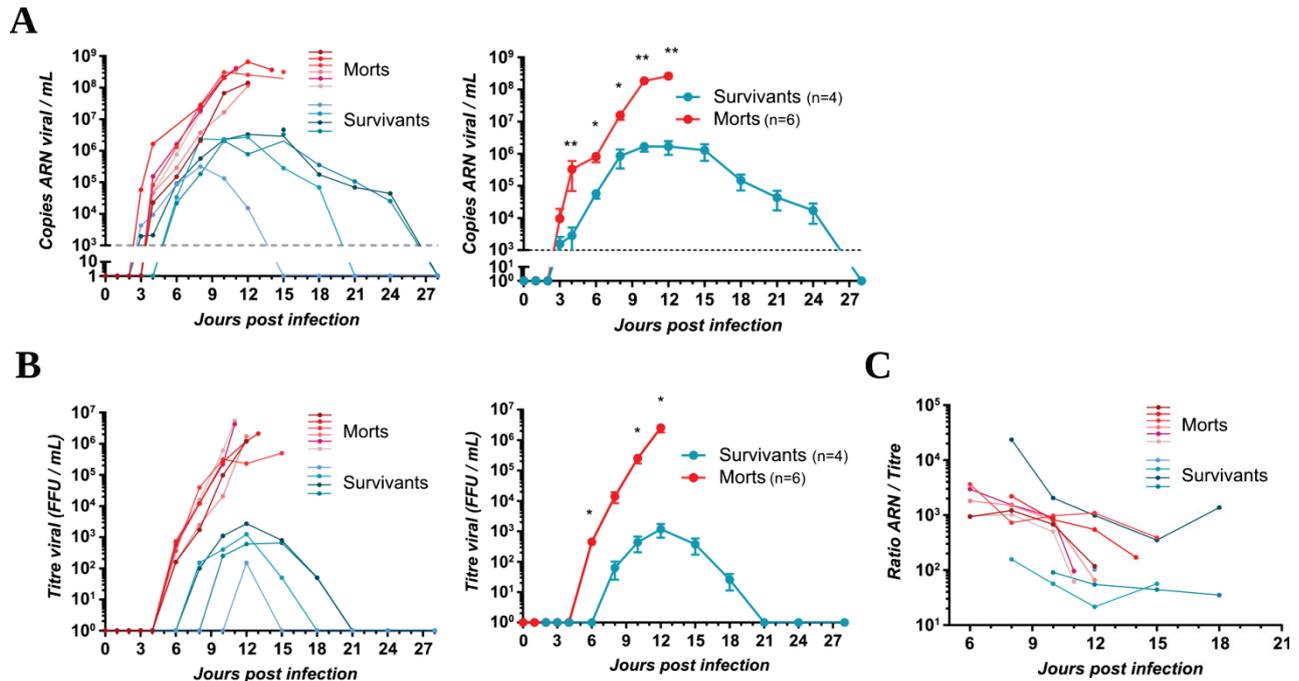


Figure 30 : Etude de la virémie dans le sang au cours de la FL. (A) L'ARN viral contenu dans le sang des animaux infectés a été extrait avant d'être quantifié par RTq-PCR. Le panel de gauche contient les données individuelles et celui de droite les moyennes obtenues à partir des mêmes animaux. (B) Les particules infectieuses contenues dans le plasma ont été titrées sur Vero-E6 par comptage des foyers infectieux. Le panel de gauche contient les données individuelles et celui de droite les moyennes obtenues à partir des mêmes animaux. (C) Le ratio ARN/titre a été calculé et retranscrit au cours des périodes où de l'ARN et du titre infectieux était détectable. Les statistiques présentées correspondent à un t-test entre les animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la maladie (* p<0.05 ; ** p<0.01).

De la même manière que le plasma, nous avons également étudié la charge virale présente dans la moelle osseuse prélevée à J2, J4, J7, J10 post infection et au cours de l'euthanasie des animaux infectés. L'ARN viral a été détecté dès 4 jours post infection dans la moelle osseuse des animaux moribonds tandis qu'elle apparaît dès 6 jours post infection chez les animaux survivants (**Figure 31.A**). Le nombre de copies d'ARN viral a augmenté de manière plus importante chez les animaux morts, atteignant un pic au cours de la phase terminale. Au con-

traire, la quantité d'ARN a augmenté modérément chez les animaux survivants jusqu'à J10 post infection avant de diminuer progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation. A la différence de ce que nous avons pu observer dans le plasma, l'ARN viral était toujours détectable 28 jours post infection dans la moelle osseuse de 3 animaux survivants sur 4. Les particules infectieuses ont été détectées dès J8 post infection chez les animaux morts et à J10 post infection chez les animaux survivants. La quantité de particules infectieuses était environ 1000 fois plus importante dans le plasma des animaux avec une issue fatale J10 post infection par rapport aux animaux contrôlant l'infection (**Figure 31.B**).

Nous avons observé d'importantes différences dans la virémie développée au cours des formes sévères ou non sévères de FL. Cette virémie apparait plus rapidement et n'est pas contrôlée dans le sang et dans la moelle osseuse des animaux développant une forme grave de la maladie. Au contraire cette virémie apparait plus tardivement et est contrôlée à partir de 12 jours post infection chez les animaux survivants. Il y a donc une corrélation positive entre l'intensité ainsi que la durée de la virémie et la gravité de la maladie.

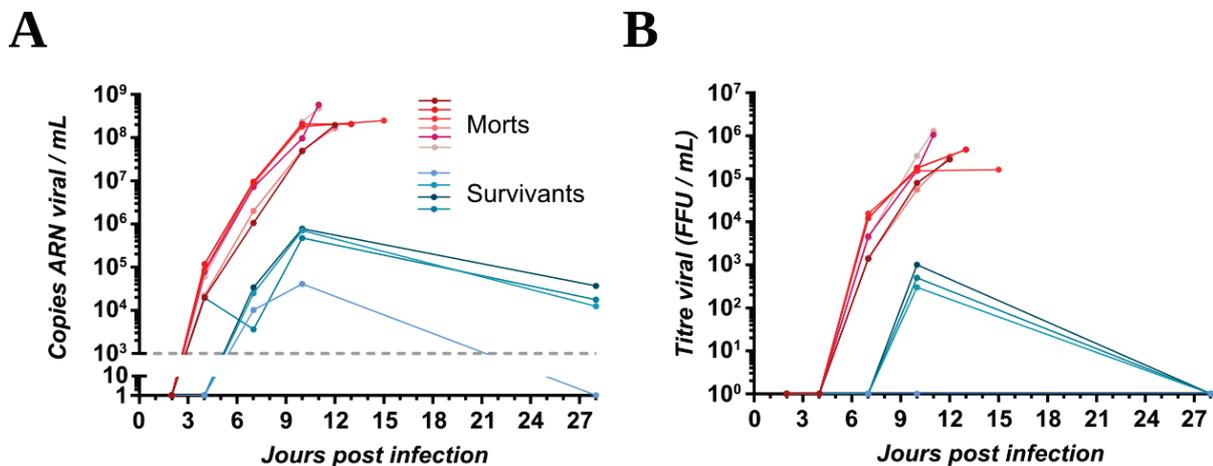


Figure 31 : Etude de la virémie dans la moelle osseuse au cours de la FL. La moelle osseuse des animaux a été prélevée aux périodes indiquées puis centrifugée afin d'en obtenir le plasma. Ce plasma a ensuite été inactivé et l'ARN viral en a été extrait avant d'être quantifié par RTq-PCR (A). (B) Les particules infectieuses contenues dans le plasma ont été titrées sur Vero-E6 par comptage des foyers infectieux.

III.2. Charge virale dans les organes aux temps précoces

Nous nous sommes intéressés à la charge virale présente dans les organes de notre modèle animal, et ce, à différents temps post infection. Deux groupes composés de 3 animaux ont été infectés par LASV-AV, induisant une forme de maladie peu sévère, ou LASV-Josiah, induisant une forme fatale. Ces animaux ont ensuite été euthanasiés à J2 post infection. Les organes et les fluides ont ensuite été prélevés pour procéder à l'extraction des ARN viraux et leur quantification par RT-qPCR, ainsi qu'au titrage des particules virales infectieuses. Nous avons identifié la présence d'ARN viral uniquement dans la peau (à l'endroit de l'injection de l'inoculum viral) chez tous les animaux infectés par la souche AV, ainsi que dans les ganglions mésentériques pour deux individus (**Figure 32.A. Panel gauche**). De manière intéressante, l'ARN viral a été détecté dans de nombreux organes à de très faibles quantités, notamment les ganglions, le foie, le cerveau et le cervelet, le rein et les glandes surrénales, l'intestin grêle et le gros intestin, les poumons, l'organe reproducteur ainsi que le pancréas. Des quantités plus importantes de copies d'ARN ont été décelées dans la peau au site d'injection ainsi que dans la rate et le thymus (**Figure 32.A. Panels droite**). Les particules virales infectieuses, quant à elles, ont été détectées uniquement dans la peau, et ce, chez la quasi-totalité des animaux des deux cohortes. La quantité de particules infectieuses était cependant plus importante dans la peau des animaux infectés par la souche Josiah par rapport à ceux infectés par la souche AV (**Figure 32.B**).

Ces résultats semblent indiquer que la peau au niveau du site d'injection constitue le site de réplication du virus dès 2 jours post infection. Tandis que la charge virale est présente uniquement dans la peau chez les animaux atteints d'une forme peu sévère de la maladie, l'ARN viral est déjà présent à des quantités minimales dans la plupart des organes systémiques chez les animaux infectés par la souche létale. La dissémination virale semble donc être plus rapide au cours des formes sévères de la FL chez le singe cynomolgus.

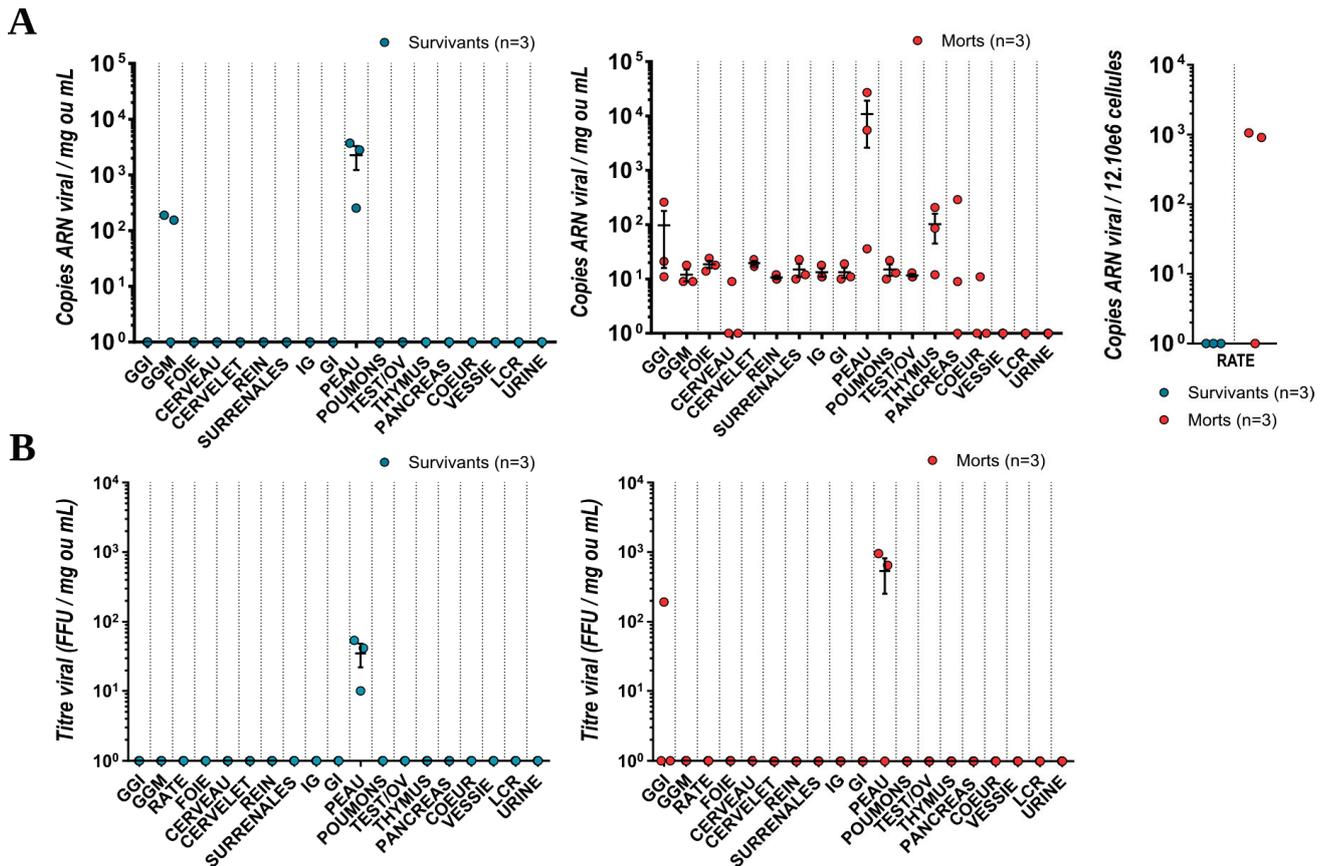


Figure 32 : Etude de la charge virale dans les organes à J2 post infection. (A) Les ARN viraux ont été extraits et quantifiés par RT-qPCR à partir des broyats d'organes et des fluides des animaux infectés par LASV-Josiah ou par LASV-AV 2 jours après l'infection à l'exception de la rate dont les cellules ont été broyées après autopsie et dont les ARN ont été extraits à partir de 12.10^6 splénocytes. (B) Les broyats d'organes et les fluides de ces mêmes animaux ont été titrés sur cellules VeroE6 et le nombre de foyers infectieux a été rapporté par mg ou par mL. GG1 : ganglions inguinaux ; GGM : ganglions mésentériques ; IG : intestin grêle ; GI : gros intestin ; TEST/OV : testis/ovaire ; LCR : liquide céphalo-rachidien.

III.3. Charge virale dans les organes pendant la phase d'incubation

Le titrage des particules infectieuses et la quantification du génome viral a également été effectuée chez les animaux infectés par l'une ou l'autre des souches du LASV puis euthanasiés au cours de la phase d'incubation, cinq jours après l'infection. D'importantes quantités d'ARN viral ont été détectées dans les ganglions, la rate, le gros intestin et la peau au site d'injection chez la quasi-totalité des animaux infectés par la souche AV (**Figure 33.B. Panel gauche**). Des quantités plus faibles ont été détectées dans le foie, les surrénales et dans l'appareil reproducteur chez tous les animaux de la même cohorte. L'ARN viral a également été identifié chez certains animaux dans le cervelet, les reins, les poumons, le thymus et le pancréas. De manière générale, l'ARN viral a été détecté dans tous les organes extraits chez

les animaux développant une forme sévère de la maladie. Les niveaux les plus élevés ont été retrouvés dans les ganglions, la rate, le foie et le gros intestin (**Figure 33.B. Panels droite**). Des particules infectieuses du LASV ont été détectées à nouveau dans la peau, mais également dans les ganglions et la rate des animaux infectés par la souche AV, avec de fortes variations entre individus. Les mêmes organes sont ressortis positifs chez les animaux infectés par la souche létale, avec en plus le foie, les glandes surrénales, le gros intestin, les organes reproducteurs et le thymus.

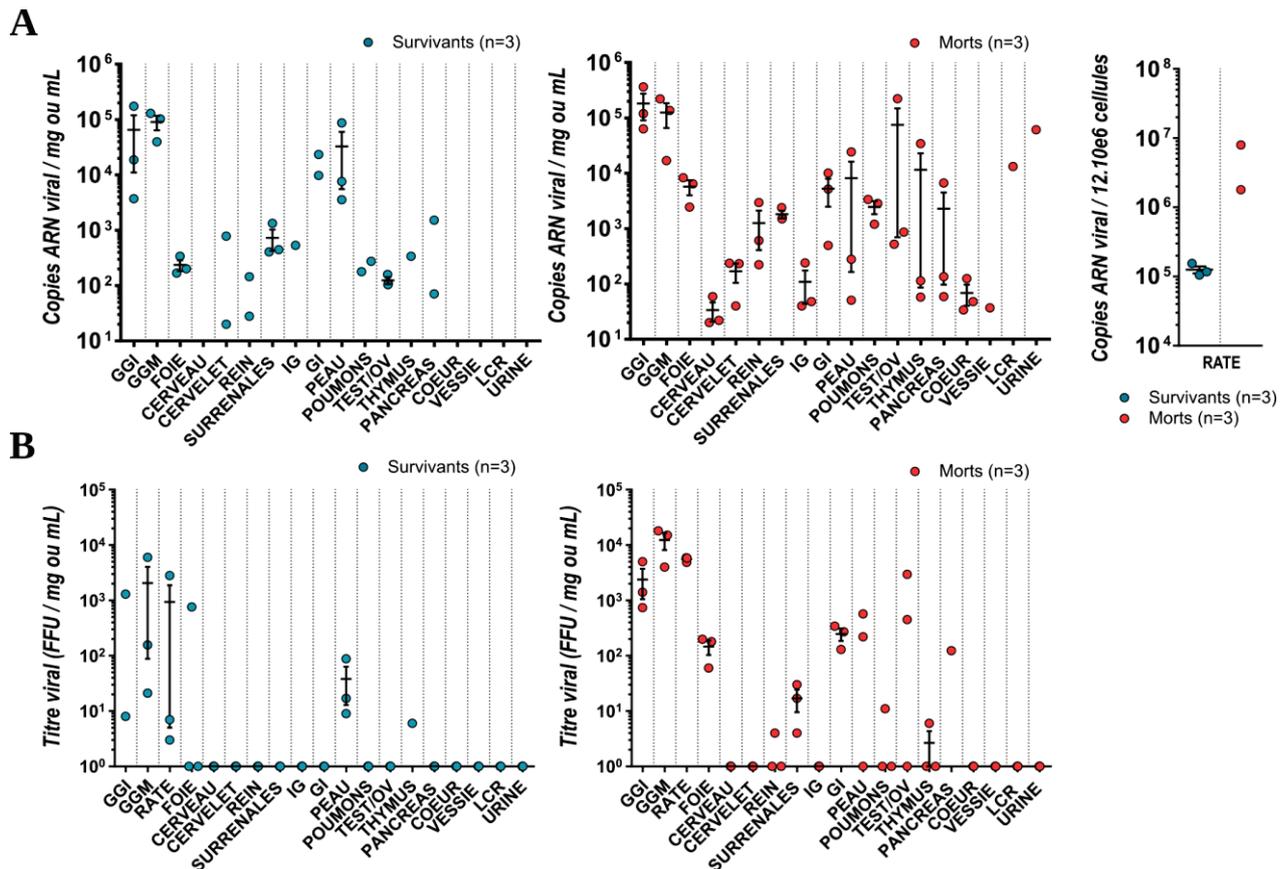


Figure 33 : Etude de la charge virale dans les organes à J5 post infection. (A) Les ARN viraux ont été extraits et quantifiés par RT-qPCR à partir des broyats d'organes et des fluides des animaux infectés par LASV-Josiah ou par LASV-AV 5 jours après l'infection. Pour la rate, les cellules ont été broyées après autopsie et les ARN ont été extraits à partir de $12 \cdot 10^6$ splénocytes. (B) Les broyats d'organes et les fluides de ces mêmes animaux ont été titrés sur cellules VeroE6 et le nombre de foyers infectieux a été rapporté par mg ou par mL. GGI : ganglions inguinaux ; GGM : ganglions mésentériques ; IG : intestin grêle ; GI : gros intestin ; TEST/OV : testis/ovaire ; LCR : liquide céphalo-rachidien.

En conclusion, la dissémination du virus a progressé entre J2 et J5 post infection. Les organes lymphoïdes et la rate sont les organes présentant la plus forte charge virale à J5 post infection au cours des formes sévères et non sévères de la maladie. Des particules

virales infectieuses ont cependant été détectées dans certains organes systémiques au cours des formes sévères, notamment le foie, le gros intestin et les glandes surrénales. Ces résultats sont en faveur d'une dissémination virale plus importante au cours des formes graves de FL.

III.4. Charge virale dans les organes au pic de la maladie

Lors du pic de la maladie, à J11 post infection, nous avons pu observer la présence de matériel génétique viral dans la quasi-totalité des organes des singes infectés par la souche AV. Les valeurs les plus importantes ont été obtenues dans les ganglions, la rate, le foie, la peau, les poumons et le pancréas, et ce, chez tous les animaux de la cohorte. L'ARN viral a été détecté à de faibles quantités dans le système nerveux central (cerveau et cervelet) de cette cohorte (**Figure 34.A. Panel gauche**). Nous avons observé une forte variabilité interindividuelle dans le gros intestin, l'appareil reproducteur, la vessie et l'urine. Ces résultats contrastent fortement avec ceux obtenus pour les animaux moribonds au stade terminal de la maladie, entre J11 et J15 post infection. Chez ces derniers, l'ARN a été détecté dans tous les compartiments testés, et ce, pour la totalité des animaux (**Figure 34.A. Panels droite**). La quantité de matériel génétique viral dans leurs organes est de manière générale beaucoup plus élevée que celle enregistrée dans les organes des animaux présentant une forme peu sévère de la maladie. La quantité d'ARN viral est comprise entre 10^5 et 10^7 copies/mL dans la plupart des organes, excepté pour la vessie, dans laquelle la variabilité interindividuelle est plus importante. Une différence de charge virale entre les deux cohortes a également été observée après mesure du titre infectieux présent dans les organes (**Figure 34.B**). Tandis que des particules virales infectieuses ont été détectées principalement dans les organes lymphoïdes (ganglions, rate, thymus) et dans la peau au site d'injection chez les animaux légèrement malades, ces dernières ont été identifiées dans tous les organes ou fluides, excepté l'urine, chez les animaux moribonds. La quasi-totalité des titres infectieux dans les organes était significativement plus élevée chez ces derniers. Les titres les plus élevés (entre 10^5 et 10^6 FFU/mL) ont été détectés dans le foie et les glandes surrénales, soulignant l'importance de ces organes dans la réplication virale. De manière intéressante, le ratio ARN/titre était de 30 dans le foie et dans le pancréas des animaux moribonds tandis que celui de la plupart des autres organes est situé entre 100 et 1000 (**Figure 34.C**). Ce ratio est compris entre 1000 et 10000 pour le cerveau et le cervelet. Ces données suggèrent un faible taux de particules virales défectives dans le foie et le pancréas ainsi qu'un fort taux dans le système nerveux central. En d'autres termes, la réplication virale

était plus efficace dans le foie et le pancréas comparé aux autres organes. A l'inverse, la répliation virale dans le système nerveux central était moins efficace comparé aux autres organes.

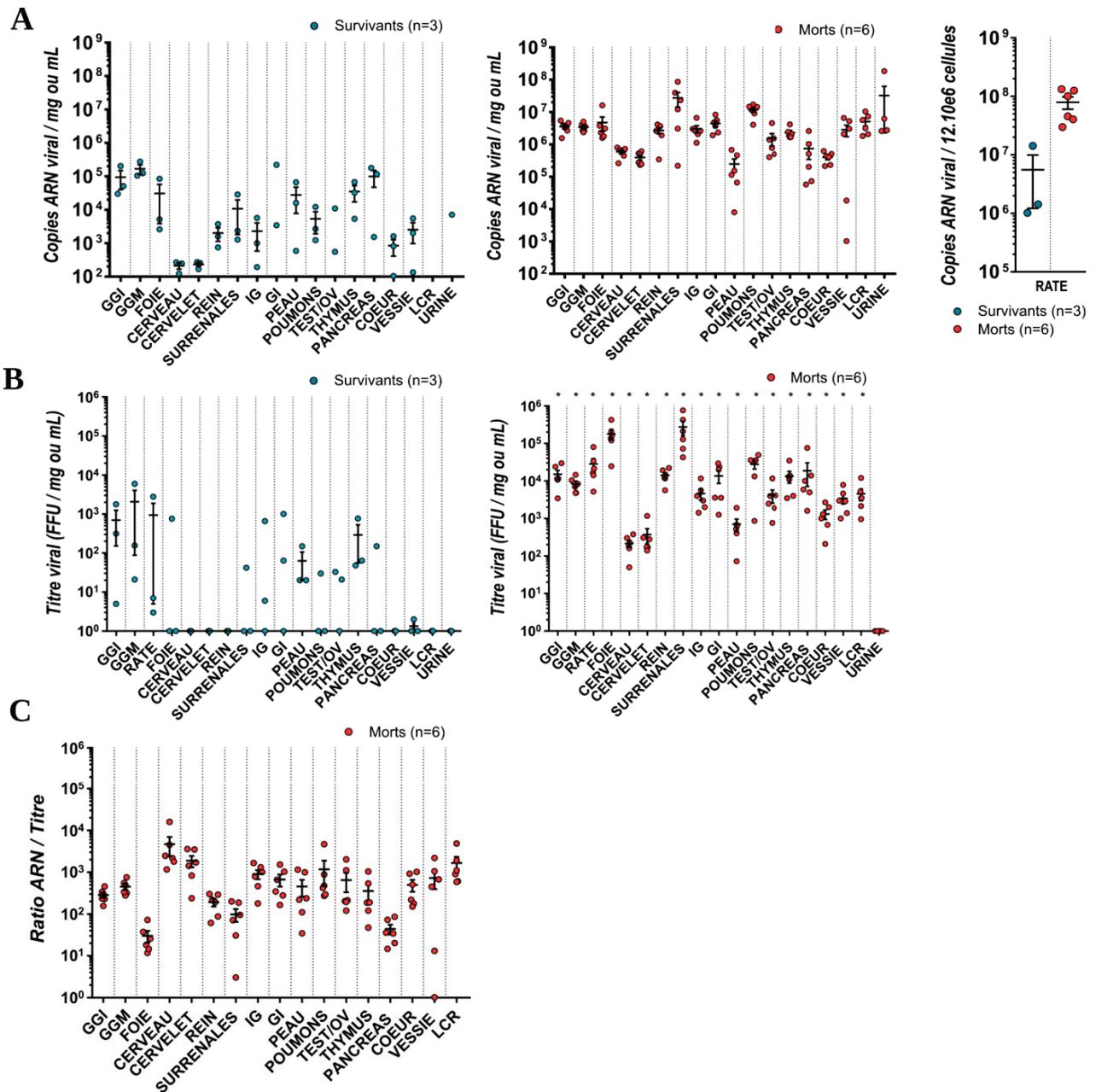


Figure 34 : Etude de la charge virale dans les organes à J11 post infection. (A) Les ARN viraux ont été extraits et quantifiés par RT-qPCR à partir des broyats d'organes et des fluides des animaux infectés par LASV-Josiah et euthanasiés entre J11 et J15 post infection ou des animaux infectés par LASV-AV et euthanasiés 11 jours après l'infection. Pour la rate, les cellules ont été broyées après autopsie et les ARN extraits à partir de de 12.10⁶ splénocytes. (B) Les broyats d'organes et les fluides de ces mêmes animaux ont été titrés sur cellules VeroE6 et le nombre de foyers infectieux a été rapporté par mg ou par mL. GGI : ganglions inguinaux ; GGM : ganglions mésentériques ; IG : intestin grêle ; GI : gros intestin ; TEST/OV : testis/ovaire ; LCR : liquide céphalo-rachidien. (C) Le ratio ARN/titre a été calculé et retranscrit. Les statistiques présentées correspondent à un t-test entre les moyennes de données des animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la maladie (* p<0.05 ; ** p<0.01).

En conclusion des événements se produisant au pic de la maladie entre les formes sévères et non sévères de la maladie, nous avons pu déterminer que les organes lymphoïdes et la peau étaient les principaux organes présentant des particules virales infectieuses chez les survivants. Bien que du matériel génétique ait été retrouvé dans tous les organes chez ces individus, celui-ci n'était pas infectieux. Au contraire, de fortes charges virales ont été retrouvées dans les organes des animaux moribonds, principalement le foie et les glandes surrénales. Le foie constitue donc une cible privilégiée pour le virus.

III.5. Charge virale dans les organes pendant la convalescence

Nous avons analysé la charge virale présente dans les organes et fluides des animaux survivants euthanasiés à la fin de la procédure expérimentale, c'est-à-dire à 28 jours post infection. De façon intéressante, du matériel génétique viral a été identifié dans tous les organes des animaux survivants, à des quantités similaires de celles observées à J11 post infection chez les animaux infectés par la même souche (Figure 35.A). En revanche, aucune particule infectieuse n'a été détectée dans aucun des organes testés chez ces animaux (données non présentées). Ce résultat est en faveur d'un contrôle de la réplication virale et de la maladie 28 jours post infection, et est consistant avec l'absence de symptômes observée chez ces animaux à cette période.

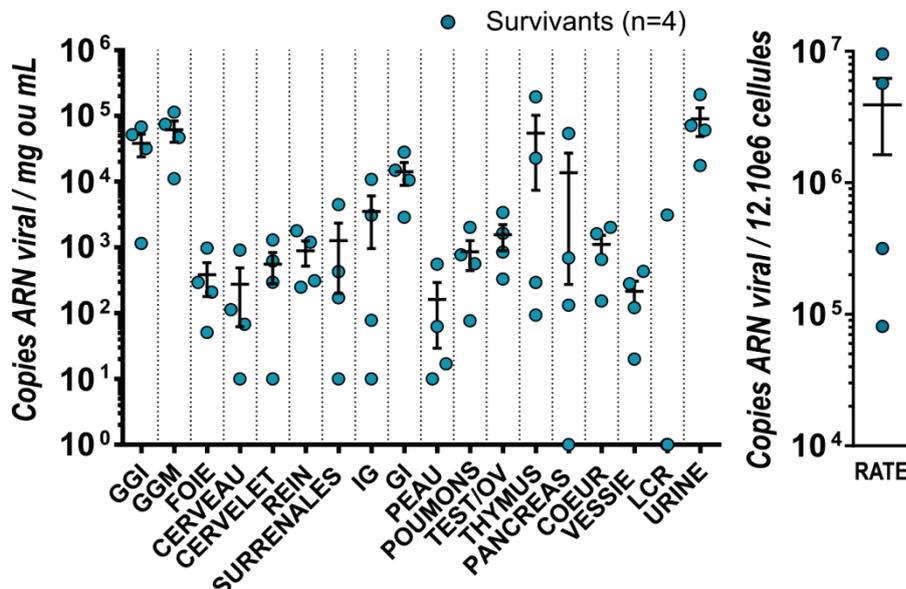
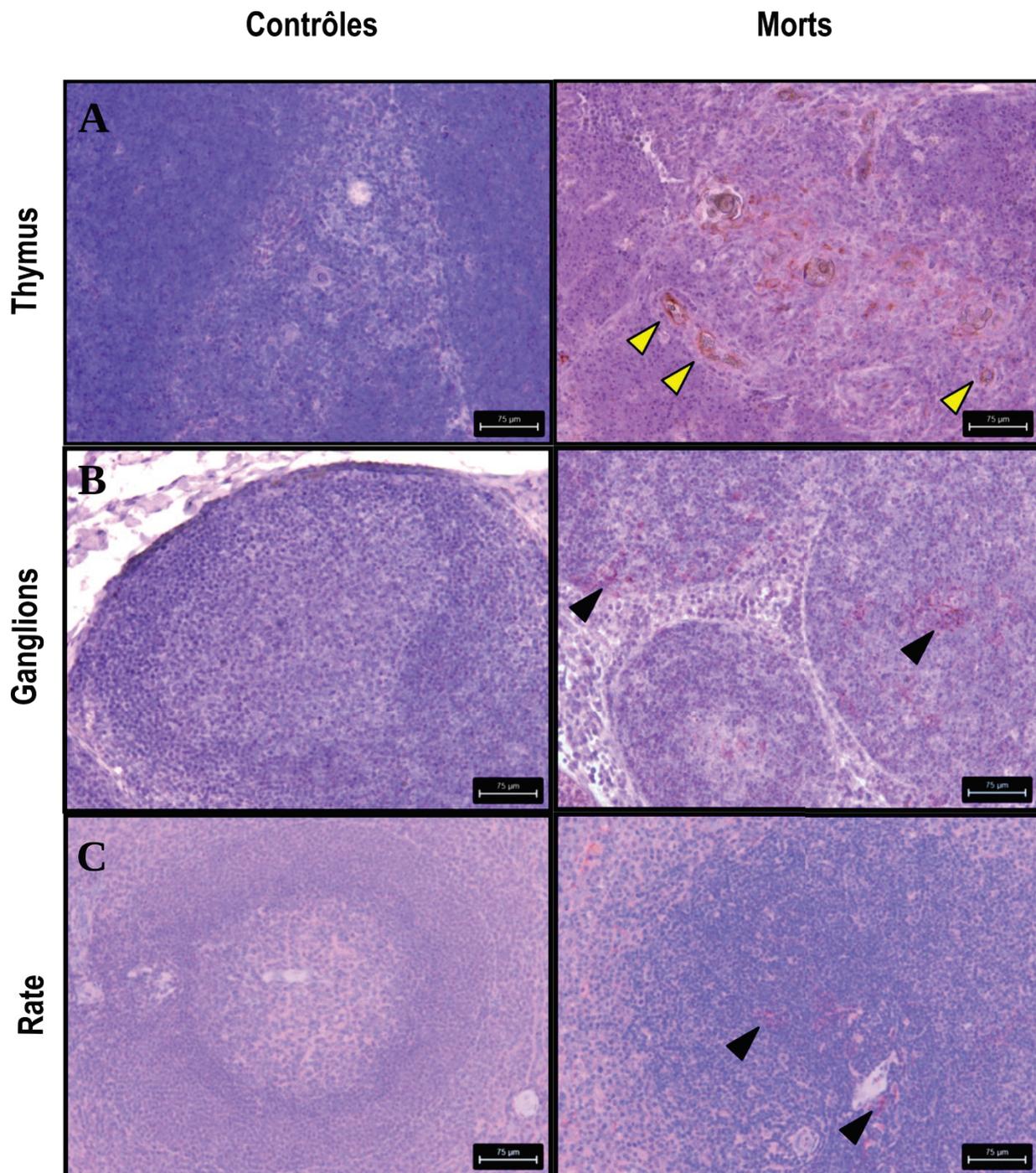


Figure 35 : Etude de la charge virale dans les organes 28 jours post infection chez les animaux survivants. (A) Les ARN viraux ont été extraits et quantifiés par RT-qPCR à partir des broyats d'organes et des fluides des animaux infectés par LASV-AV et euthanasiés à J28 post infection. Pour la rate, les cellules ont été broyées après autopsie et les ARN extraits à partir de de 12.10⁶ splénocytes.

III.6. Cibles cellulaires du LASV au pic de la maladie

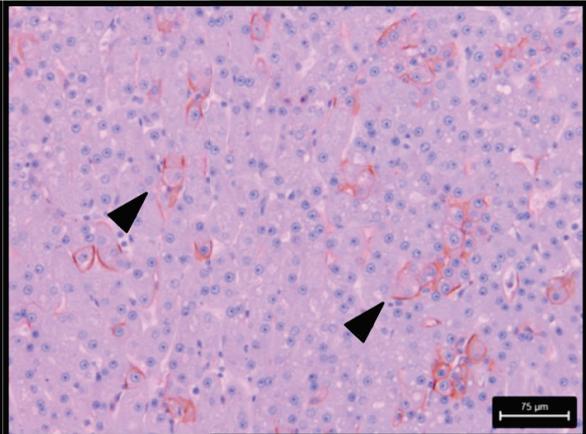
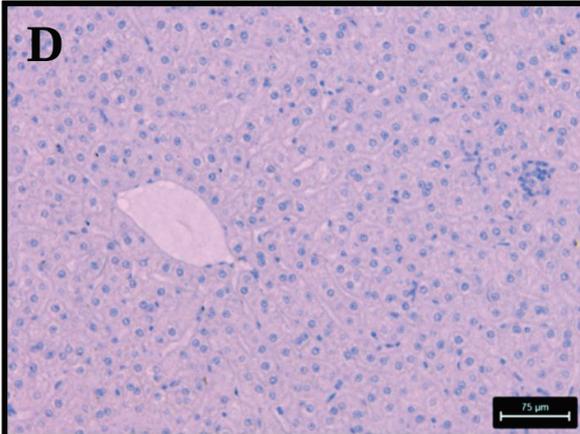
Nous nous sommes ensuite intéressés plus en détail aux cibles cellulaires virales dans les organes des animaux moribonds via le marquage des différents tissus contre la glycoprotéine virale du LASV (GP2-c). Les techniques d'immunomarquages étant actuellement en phase d'essai dans notre laboratoire, seuls les organes des animaux infectés par LASV Josiah et morts de la maladie ont été analysés et seront détaillés ici.



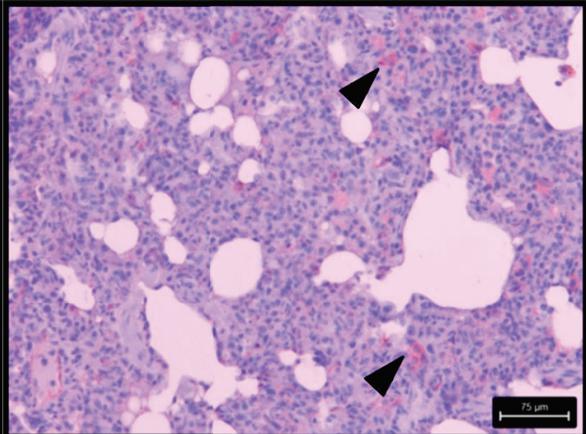
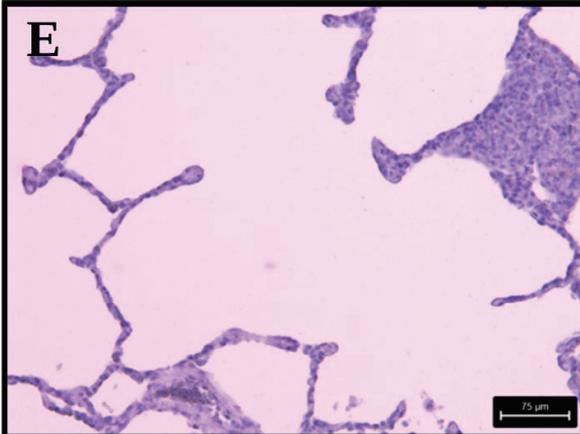
Contrôles

Morts

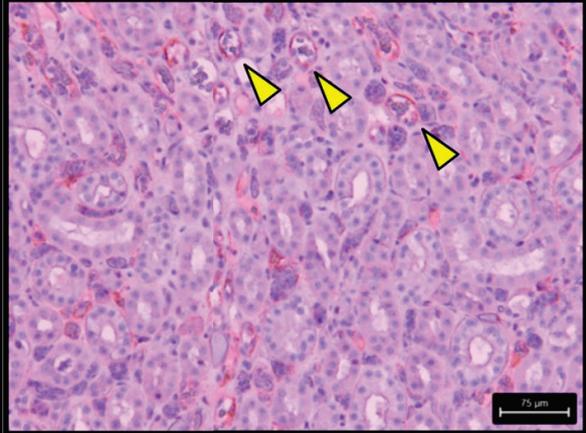
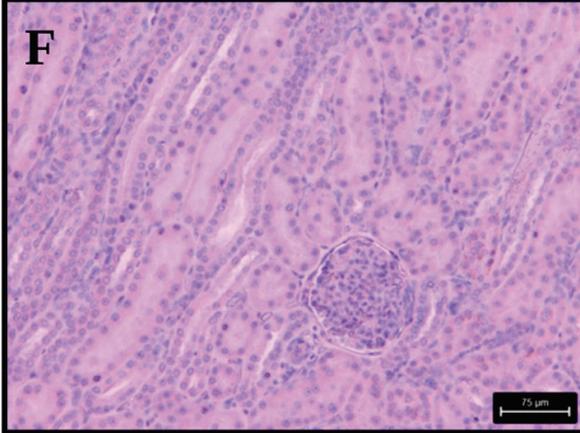
Foie



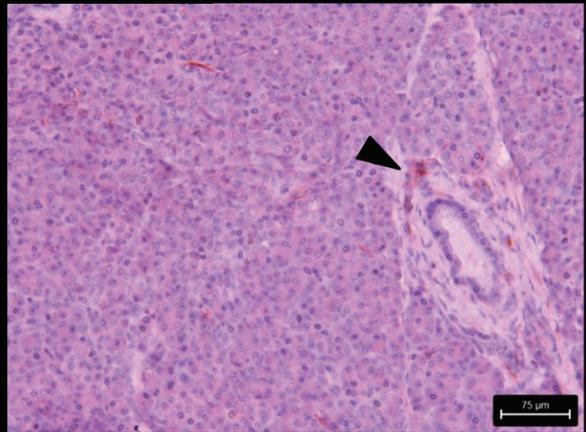
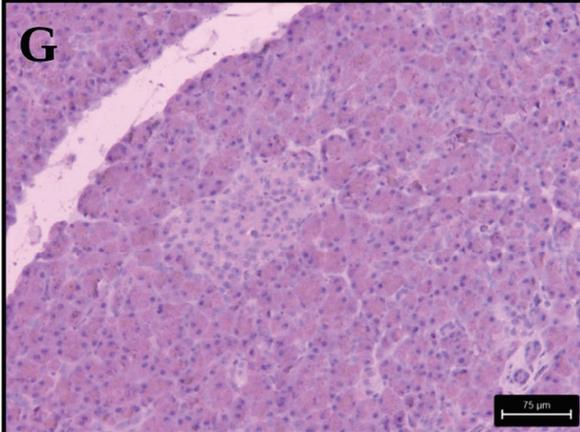
Poumons



Rein



Pancréas



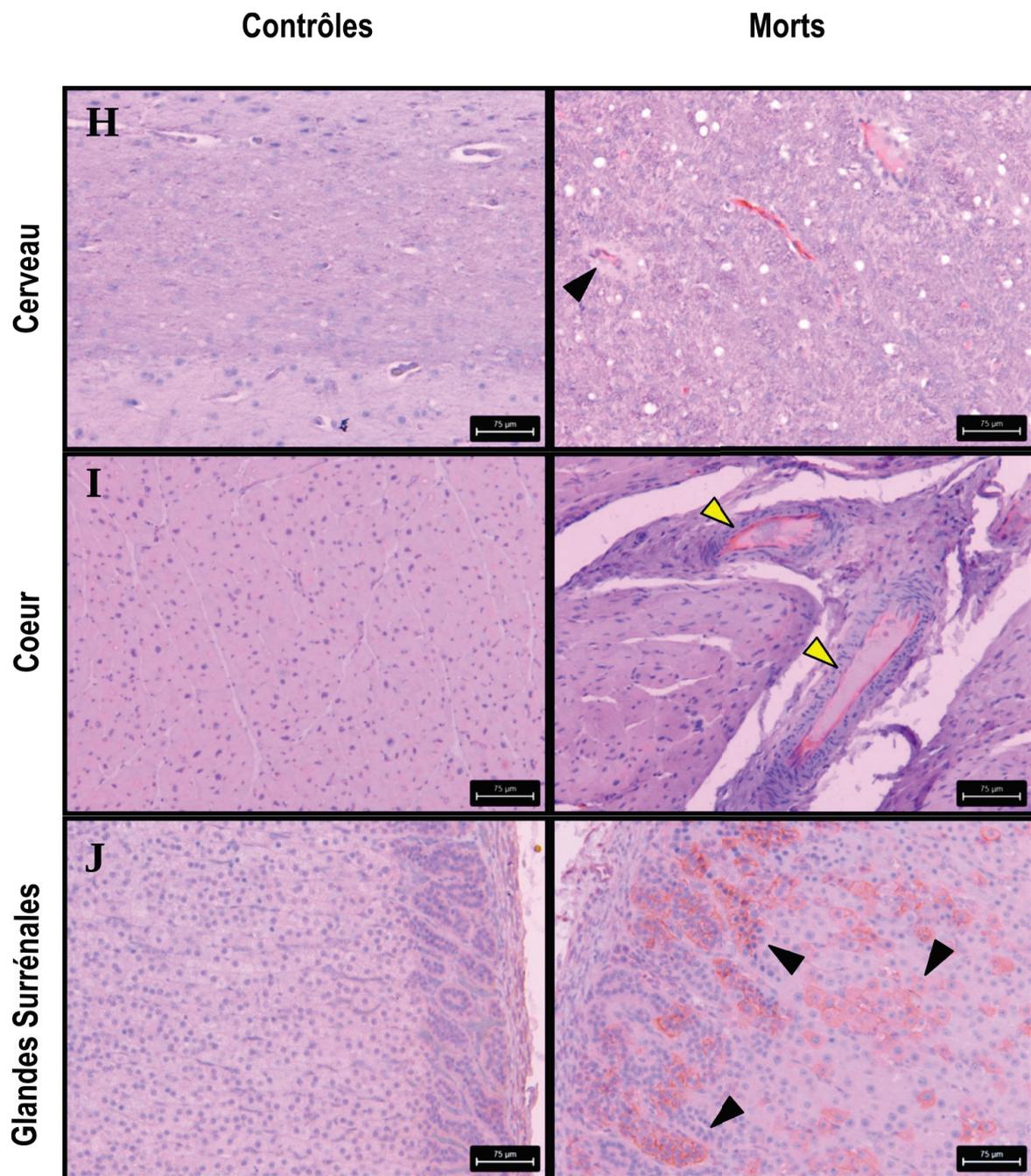


Figure 36 : Cibles cellulaires du LASV dans les organes des animaux morts de la maladie. Les organes issus des animaux infectés par LASV-Josiah puis euthanasiés 11 jours après infection ont été inclus en paraffine puis coupés par tranche fine de 5µm avant d'être immunomarqués contre la GP2 virale puis contre-colorés avec l'hématoxyline. (A) Thymus. (B) Ganglions. (C) Rate. (D) Foie. (E) Poumons. (F) Rein. (G) Pancréas. (H) Cerveau. (I) Cœur. (J) Glandes surrénales. Les flèches jaunes correspondent à des cellules endothéliales infectées et les flèches noires correspondent à des foyers de cellules infectées.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux organes lymphoïdes, dans lesquels nous avons pu observer la présence hétérogène de cellules infectées. Le marquage viral a été particulièrement prononcé au niveau des endothéliums thymiques (flèches jaunes) (**Figure 36.A**). Dans les ganglions (**Figure 36.B**) et la rate (**Figure 36.C**), les cellules infectées étaient réparties principalement à l'intérieur des follicules lymphoïdes (flèches noires). Dans le foie, de nombreux foyers d'infection étaient répartis aléatoirement dans le parenchyme hépatique (flèches noires) (**Figure 36.D**). Nous avons également mis en évidence la présence de cellules infectées au sein de l'épaississement de la cloison alvéolaire causée par la pneumonie interstitielle (flèches noires) (**Figure 36.E**). Les cellules infectées dans le rein ont été identifiées principalement au niveau des jonctions cortico médullaires et au niveau des capillaires sanguins (flèches jaunes) (**Figure 36.F**). Un très faible nombre de cellules infectées ont été reportées dans le pancréas, et celles-ci sont situées dans la région bordant les artérioles (flèche noire) et entre les différents acini pancréatiques (**Figure 36.G**). Nous avons identifié la présence de cellules infectées dans le cerveau des animaux moribonds au niveau vasculaire (flèche noire) (**Figure 36.H**). La même observation a été faite dans le tissu cardiaque où seuls les endothéliums ont été marqués positivement (flèches jaunes) (**Figure 36.I**). Enfin, les glandes surrénales se sont avérées être le tissu le plus fortement marqué, ce qui peut être mis en relation avec le fort titre viral identifié dans cet organe (**Figure 36.J**). En effet, de multiples foyers de cellules infectées ont été observés dans les 4 régions constituant les glandes surrénales : la zone glomérulée, la zone fasciculée, la zone réticulée et la médullosurrénale (de la périphérie vers le centre) (flèches noires).

Enfin, nous avons commencé la mise au point de doubles marquages en immunohistofluorescence afin d'identifier plus précisément le phénotype des cellules infectées. Les essais effectués jusqu'à présent nous ont permis d'identifier deux populations : les macrophages via le marquage de CD68, et les lymphocytes via le marquage de CD3. Le marquage viral (rouge) couplé au marquage anti-CD3 (vert) n'a pas montré de colocalisation dans les ganglions inguinaux (**Figure 37.A**), dans le foie (**Figure 37.B**) et dans les glandes surrénales (**Figure 37.C**), trois organes dont le titre viral était le plus élevé chez les animaux moribonds. Ceci semble indiquer que les lymphocytes ne constituent pas une cible du LASV dans notre modèle. Cependant, nous avons pu observer la présence de cellules CD3⁺ à proximité des foyers de cellules infectées dans le foie et les surrénales, indiquant un possible contact entre ces cellules. Contrairement aux lymphocytes, nous avons pu observer la présence de rares cellules exprimant le marquage viral et le marquage CD68⁺ dans les ganglions mésentériques (**Figure**

37.D), dans le thymus (**Figure 37.E**) et dans le poumon (**Figure 37.F**) (voir flèches). Ces résultats semblent indiquer que les macrophages peuvent représenter une cible virale dans les tissus infectés. Les tests d'immunohistofluorescence sont actuellement en développement dans notre laboratoire et de plus amples investigations sont nécessaires afin d'identifier le phénotype des cellules infectées.

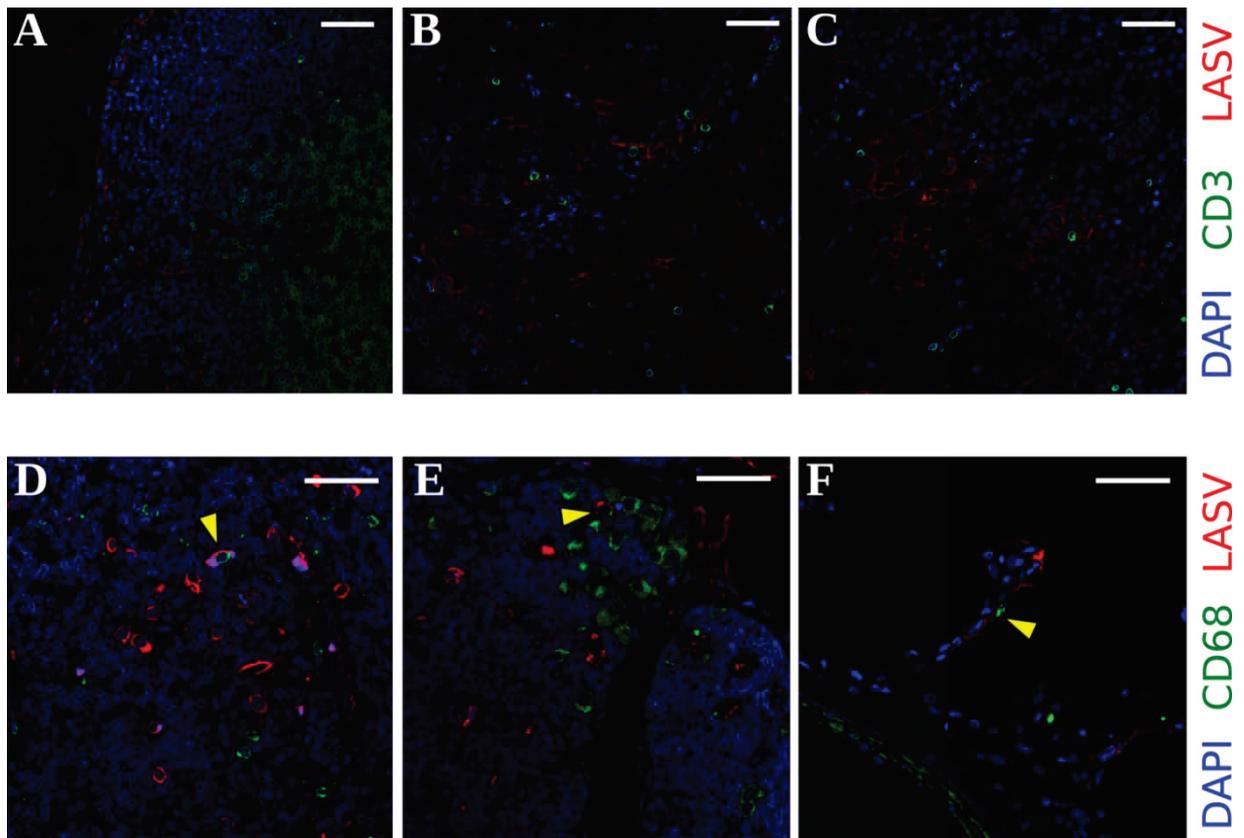


Figure 37 : LASV infecte les macrophages mais pas les lymphocytes. Les organes issus des animaux infectés par LASV-Josiah puis euthanasiés 11 jours après infection ont été inclus en paraffine puis coupés par tranche fine de 5 μ m avant d'être immunomarqués contre la GP2 virale en rouge et CD3 (A-C) ou CD68 (D-F) en vert. (A) Ganglion inguinal. (B) Foie. (C) Glandes surrénales. (D) Ganglion mésentérique. (E) Thymus. (F) Poumon. L'échelle blanche représente une longueur de 50 μ M.

IV. Modifications anatomopathologiques au cours de la FL

Afin d'identifier et de comparer les changements anatomopathologiques qui ont lieu au cours de la maladie entre les formes fatales et non fatales dans notre modèle, nous avons procédé à une coloration hématoxyline-éosine des organes conservés en formol. L'analyse des organes à J2 n'a pas montré de lésions ou de phénomènes anatomopathologiques, quelle que soit la souche virale inoculée (**Données non présentées**).

IV.1. Modifications anatomopathologiques pendant la phase d'incubation

Des changements anatomopathologiques sont apparus dès 5 jours post infection et ont concerné les ganglions, la rate, la peau, les poumons et le foie. Il a été observé une perte de l'architecture des follicules lymphoïdes uniquement chez les animaux survivants, caractérisée par la déstructuration du centre germinatif (**Figure 38.A**). La rate de tous les animaux développant une forme fatale de la maladie a été marquée par la présence d'une hyperplasie de la pulpe blanche (indiquée par la flèche) et une congestion de la pulpe rouge (**Figure 38.B**). Bien que minime, la présence d'infiltrats de cellules mononucléées centrés sur les annexes pilosébacées et les vaisseaux sanguins dermiques a été observée à J5 post infection uniquement chez les animaux infectés par la souche létale du LASV. Aucun changement n'a été observé dans la peau des animaux infectés par la souche AV (**Figure 38.C**). Nous avons également identifié au cours des formes sévères et non sévères de la maladie la présence d'une pneumonie interstitielle entraînant un épaississement des parois alvéolaires et accompagnée d'infiltrations de cellules mononucléées (**Figure 38.D**). Enfin, il a été identifié des petits foyers inflammatoires multifocaux au niveau périvasculaire et proche des espaces portes hépatiques uniquement chez les animaux développant une forme non sévère de la maladie (**Figure 38.E**).

La charge virale précédemment observée dans les organes des animaux à J5 post infection a pour conséquence directe ou indirecte l'apparition de changements anatomopathologiques dans les organes lymphoïdes dès J5 post infection. Ceux-ci sont caractérisés à ce stade par une déstructuration des follicules lymphoïdes de la rate et des ganglions ainsi que par l'apparition de foyers inflammatoires au niveau de la peau, des poumons et du foie.

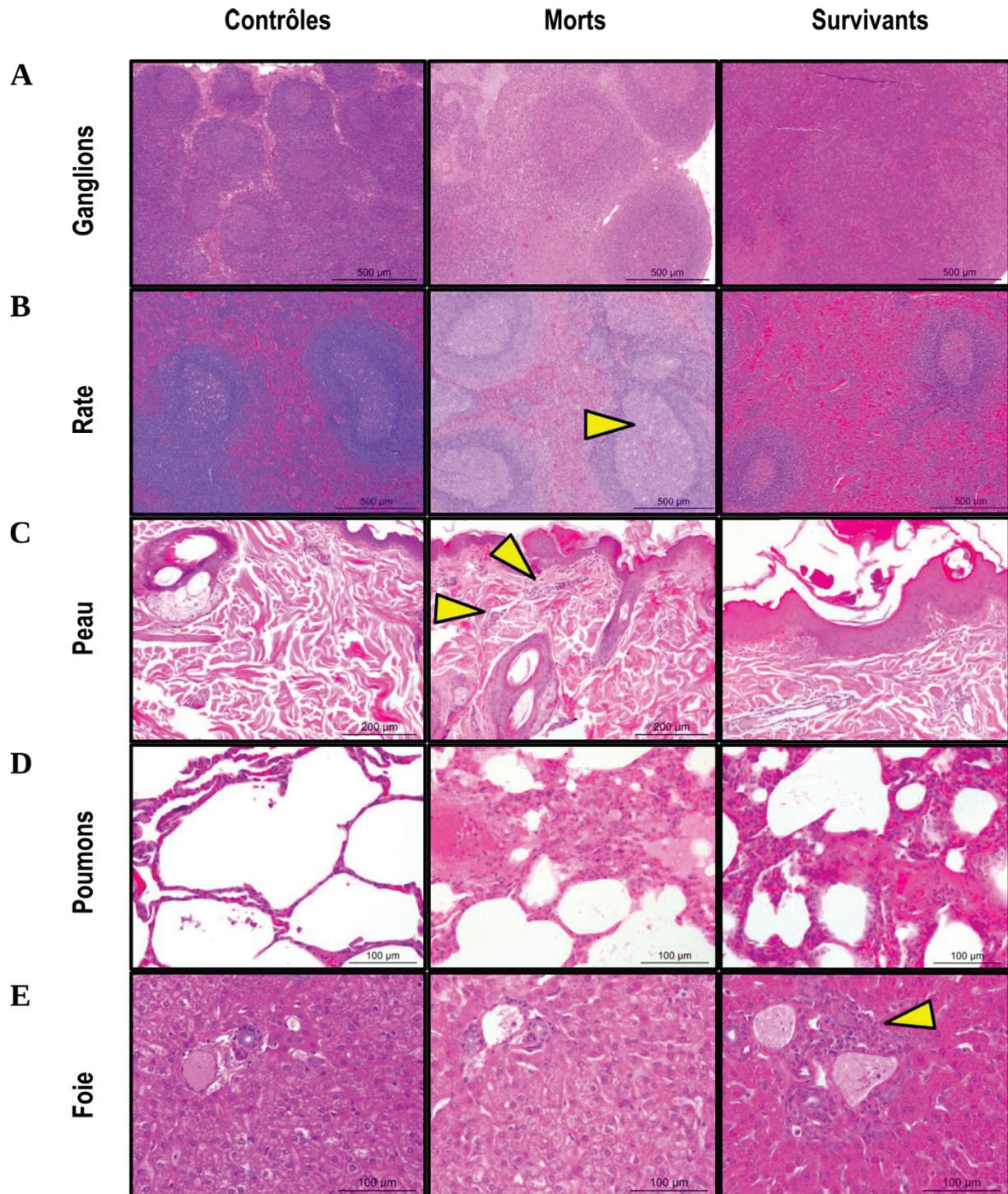


Figure 38 : Changements anatomopathologiques dans les organes à J5 post infection.

Les organes issus des animaux infectés par AV ou par LASV-Josiah puis euthanasiés 5 jours après infection ont été récoltés puis fixés dans du formol pour une coloration ultérieure avec l'hématoxyline et l'éosine. (A) Déstructuration des follicules lymphoïdes du ganglion. La flèche représente une hyperplasie des follicules. (B) Hyperplasie de la substance blanche de la rate. (C) Foyer inflammatoire dans la peau au niveau du site d'injection. Les flèches indiquent un infiltrat de cellules mononucléées. (D) Pneumonie interstitielle. (E) Foyers inflammatoires dans le foie au niveau périvasculaire et des espaces portes. La flèche indique un foyer inflammatoire.

IV.2. Modifications anatomopathologiques au pic de la maladie

Les analyses histologiques des organes lymphoïdes des deux cohortes d'animaux euthanasiés à environ J11 post infection ont révélé la présence d'une apoptose massive avec hyperplasie macrophagique dans le thymus de tous les animaux moribonds. Le même phénomène n'a été observé que pour un seul animal et dans une zone thymique restreinte chez les animaux peu malades (**Figure 39.A**). Il a également été observé parmi les deux cohortes d'animaux une déstructuration des follicules lymphoïdes des ganglions, marquée par la disparition du centre germinatif ainsi que l'apparition de nombreux macrophages à corps tingibles, témoin d'une phagocytose des cellules résidentes, probablement des lymphocytes. (**Figure 39.B**). Nous n'avons pas observé de modifications majeures au niveau de la structure des follicules spléniques, hormis la présence de substances amyloïdes en leur centre parmi les deux cohortes (flèches) (**Figure 39.C**). Une hyperplasie des macrophages et la présence de corps tingibles ont cependant été observées uniquement dans la pulpe blanche et la pulpe rouge des animaux moribonds.

L'analyse comparative des changements anatomopathologiques dans les organes a mis en évidence une hépatite sévère avec une inflammation diffuse du parenchyme hépatique uniquement dans le foie des animaux moribonds (flèches) (**Figure 40.A**). La plupart des foyers inflammatoires ont été observés autour des espaces portes. Le foie des animaux survivants n'a présenté que peu de lésions minimales. Une inflammation modérée riche en lymphocytes, plasmocytes et macrophages autour des jonctions cortico-médullaires a été observée dans le rein des animaux moribonds (flèches) tandis qu'aucune lésion n'a été observée chez les animaux survivants (**Figure 40.B**). Nous avons également observé dans les poumons de tous les animaux moribonds la présence d'une pneumonie interstitielle sévère avec des infiltrats de cellules immunitaires entraînant un fort épaissement des parois alvéolaires (**Figure 40.C**). Ce phénomène a été observé, dans une moindre mesure, chez un seul animal survivant ; les autres ne présentant aucune lésion significative. A noter que l'animal présentant une pneumonie interstitielle n'est pas le même que celui présentant une apoptose des cellules thymiques. Des encéphalites d'intensité modérée ont également été notées avec la présence d'infiltrats de cellules mononucléées (ou manchons périvasculaires) et d'activations microgliales dans le cerveau et le cervelet des animaux moribonds (**Figure 40.D.E**). Aucune lésion n'a été détectée dans le système nerveux central des animaux survivants.

D'importantes différences ont été observées au niveau histopathologique entre les formes sévères et non sévères de la maladie au pic de la phase aiguë. Une déstructuration de l'architecture des organes lymphoïdes ainsi qu'une apoptose massive ont été identifiées chez les animaux morts et survivants. Cependant, des lésions tissulaires et des infiltrats inflammatoires ont été observés dans le foie, le rein, les poumons et le système nerveux central uniquement au cours des formes fatales de la maladie. La réplication virale non contrôlée semble ainsi avoir entraîné de nombreux changements anatomopathologiques dans les organes des animaux morts de la maladie tandis que ces changements sont moins présents et moins marqués chez les animaux survivants, contrôlant l'infection.

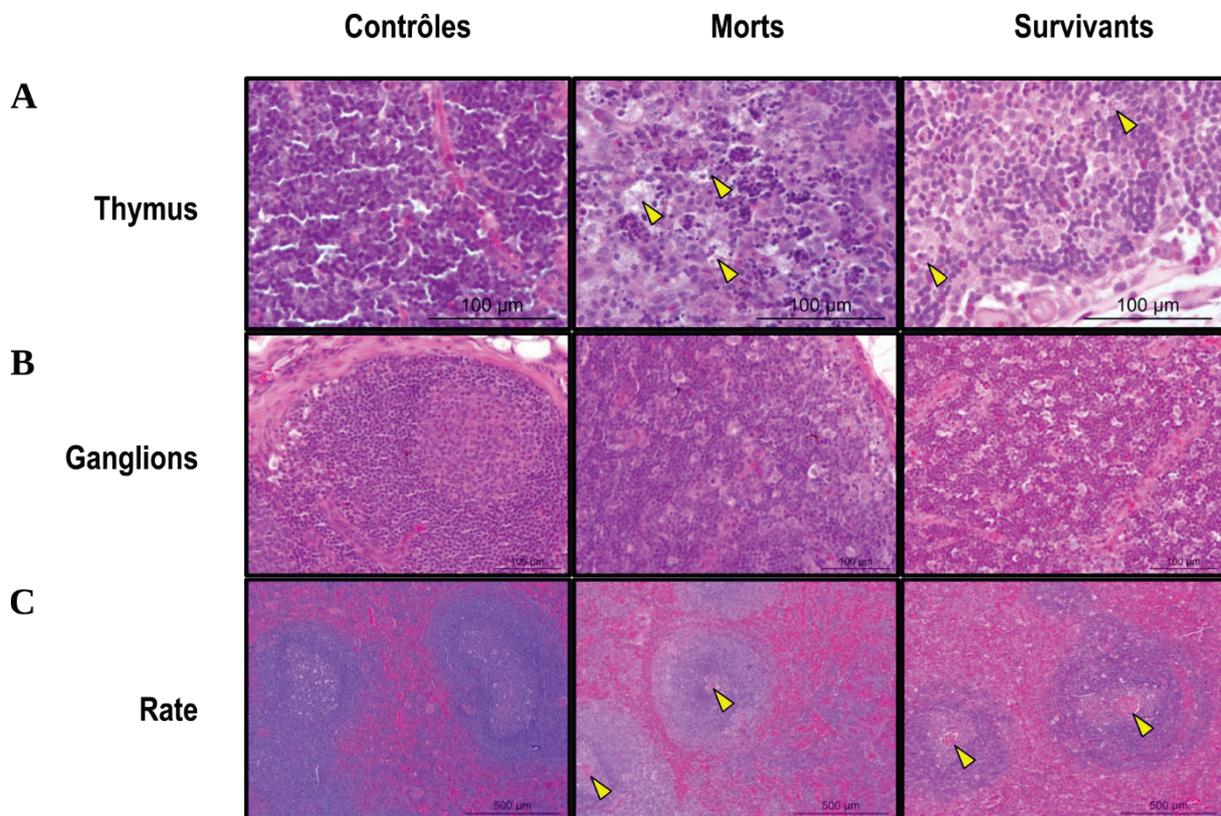


Figure 39 : Changements anatomopathologiques dans les organes lymphoïdes à J11 post infection. Les organes issus des animaux infectés par LASV-AV ou par LASV-Josiah puis euthanasiés 11 jours après infection ont été récoltés puis fixés dans du formol pour une coloration ultérieure avec l'hématoxyline et l'éosine. (A) Apoptose de tissus thymiques. Les flèches représentent les zones où des hyperplasies macrophagiques ont été repérées. (B) Déstructuration des follicules germinatifs du ganglion et phagocytose des macrophages. (C) Substances amyloïdes au centre des folliculaires spléniques.

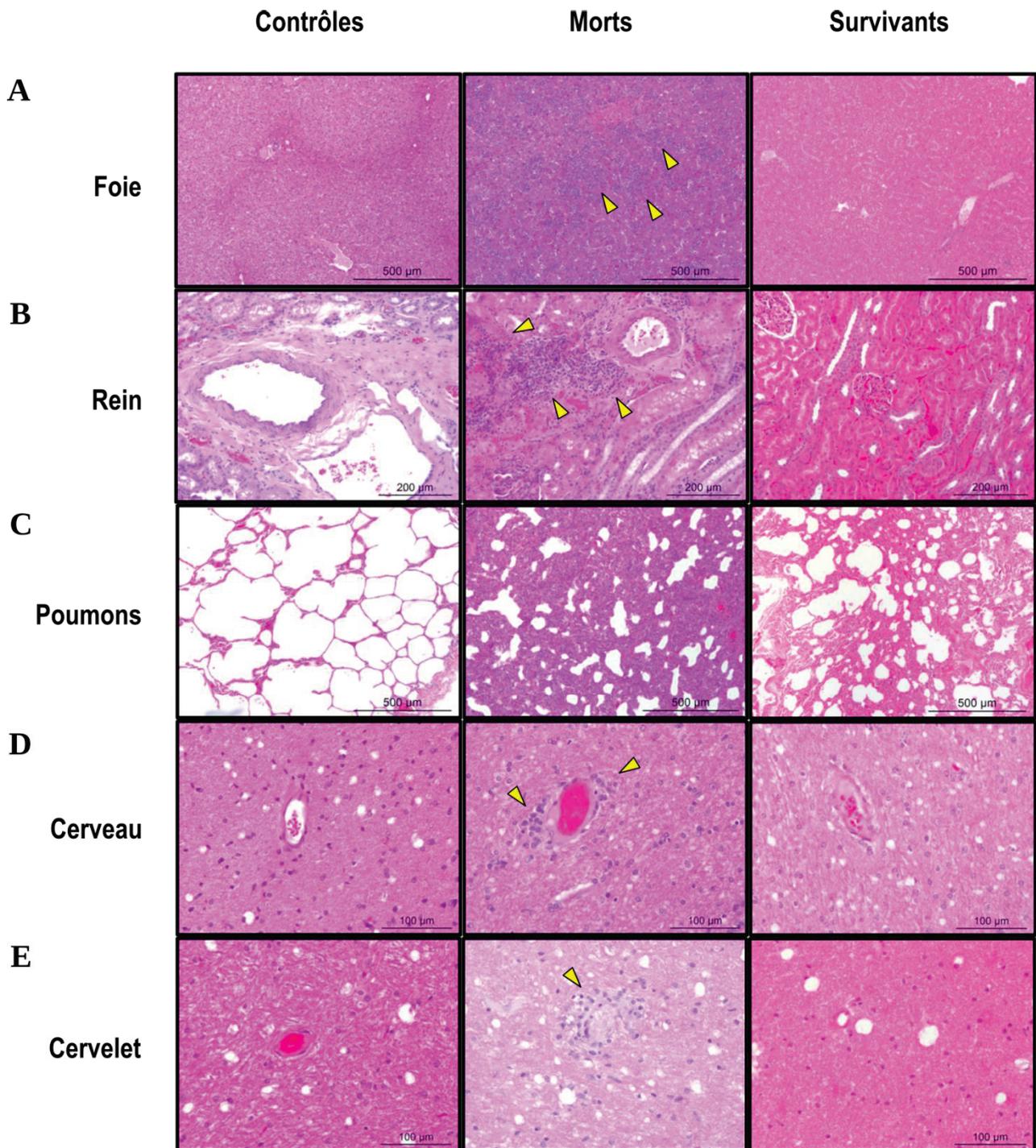


Figure 40 : Changements anatomopathologiques dans les organes à J11 post infection.

Les organes issus des animaux infectés par LASV-AV ou par LASV-Josiah puis euthanasiés 11 jours après infection ont été récoltés puis fixés dans du formol pour une coloration ultérieure avec l'hématoxyline et l'éosine. (A) Inflammation hépatique. Les flèches pointent un infiltrat de cellules mononucléées. (B) Inflammation rénale autour des jonctions cortico médullaires. Les flèches indiquent une infiltration de cellules inflammatoires (notamment plasmocytes, macrophages et lymphocytes). (C) Pneumonie interstitielle. (D) Signes d'encéphalites. Les flèches montrent des manchons périvasculaires. (E) Manchon périvasculaire du cervelet.

IV.3. Modifications anatomopathologiques pendant la convalescence

L'analyse des changements anatomopathologiques chez les animaux convalescents, à 28 jours post infection, n'a pas montré de lésions significatives dans les organes lymphoïdes (**Données non présentées**). Il a été noté de petits foyers inflammatoires situés autour des espaces portes dans le foie de deux animaux sur quatre (indiqué par des flèches) (**Figure 41.A**). Ces infiltrats de cellules mononucléées ont également été reportés autour des artères rénales et au niveau des artères myocardiques chez trois des quatre singes (**Figure 41.B.C**). Enfin, de petits infiltrats inflammatoires périvasculaires ont été identifiés dans le cerveau d'un seul animal (**Figure 41.D**).

En conclusion, les animaux survivants ne présentent plus que quelques signes d'inflammation 28 jours après l'infection. Ces signes ont été observés principalement dans le foie, le rein et le cœur, où de l'ARN viral non infectieux était toujours présent.

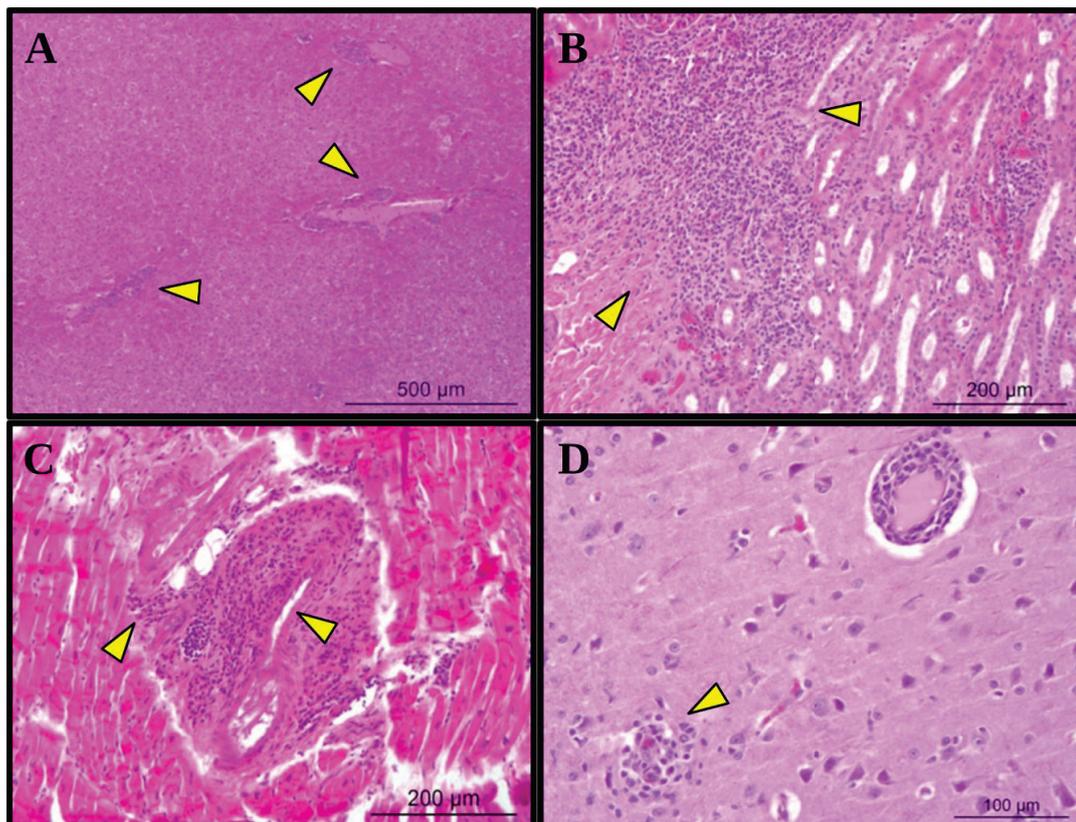


Figure 41 : Changements anatomopathologiques dans les organes chez les survivants à J28 post infection. Les organes issus des animaux infectés par LASV-AV ou par LASV-Josiah puis euthanasiés 11 jours après infection ont été récoltés puis fixés dans du formol pour une coloration ultérieure avec l'hématoxyline et l'éosine. (A) Inflammation hépatique. (B) Inflammation rénale diffuse. (C) Inflammation du myocarde. (D) Signes d'encéphalites. Les flèches représentent les zones d'infiltrats de cellules inflammatoires.

V. Analyse comparative de la réponse immunitaire

Les réponses immunitaires impliquées dans le contrôle de l'infection ou bien dans l'issue fatale au cours de la FL sont peu connues. Dans cette partie, nous avons voulu tirer profit de notre modèle afin de comparer les réponses immunitaires induites au cours des formes fatales et non fatales de la maladie. Ces réponses ont été étudiées à partir des cellules immunitaires présentes dans le sang dans une première partie, puis nous nous sommes intéressés aux réponses immunitaires se déroulant au sein des organes lymphoïdes secondaires (ganglions inguinaux, ganglions mésentériques et rate).

V.1. Réponses immunitaires dans le sang

V.1.a. La réponse immunitaire innée et l'inflammation

Nous avons identifié dans le sang de nos animaux infectés une altération de la formule sanguine impliquant les cellules de l'immunité innée. Parmi celles-ci, nous avons identifié une lymphopénie des cellules NK affectant les animaux morts et les animaux survivants dans les phases précoces de la maladie. Une hausse du nombre de cellules NK est intervenue dans les phases plus tardives de la maladie chez les animaux survivants tandis que la lymphopénie a perduré jusqu'à l'euthanasie des animaux moribonds (**Figure 42.A**). Le nombre de monocytes a également fortement augmenté et de manière transitoire 3 jours après l'infection chez les animaux morts avant de décroître rapidement tandis que seule une baisse du nombre de monocytes a été observée au cours de la phase précoce de la maladie chez les survivants (**Figure 42.B**). Il a également été identifié une hausse importante du nombre de DC circulantes, entre J3 et J8 post infection, uniquement chez les animaux infectés par la souche létale (**Figure 42.C**). Cette hausse concerne principalement les DC myéloïdes (mDC) (**Figure 42.D**).

Nous avons ensuite voulu savoir si les monocytes et les mDC étaient activés à la suite de l'infection par le LASV. L'analyse par cytométrie de l'expression des marqueurs de co-stimulation a montré une augmentation progressive de la proportion de monocytes (**Figure 43.A**) et de mDC (**Figure 43.B**) exprimant CD80 et CD86. Cette activation des CPA a été observée dans les deux cohortes, bien que celle-ci semble transitoire chez les animaux survivants. L'activation des monocytes est également apparue plus précocement au cours de l'issue non fatale.

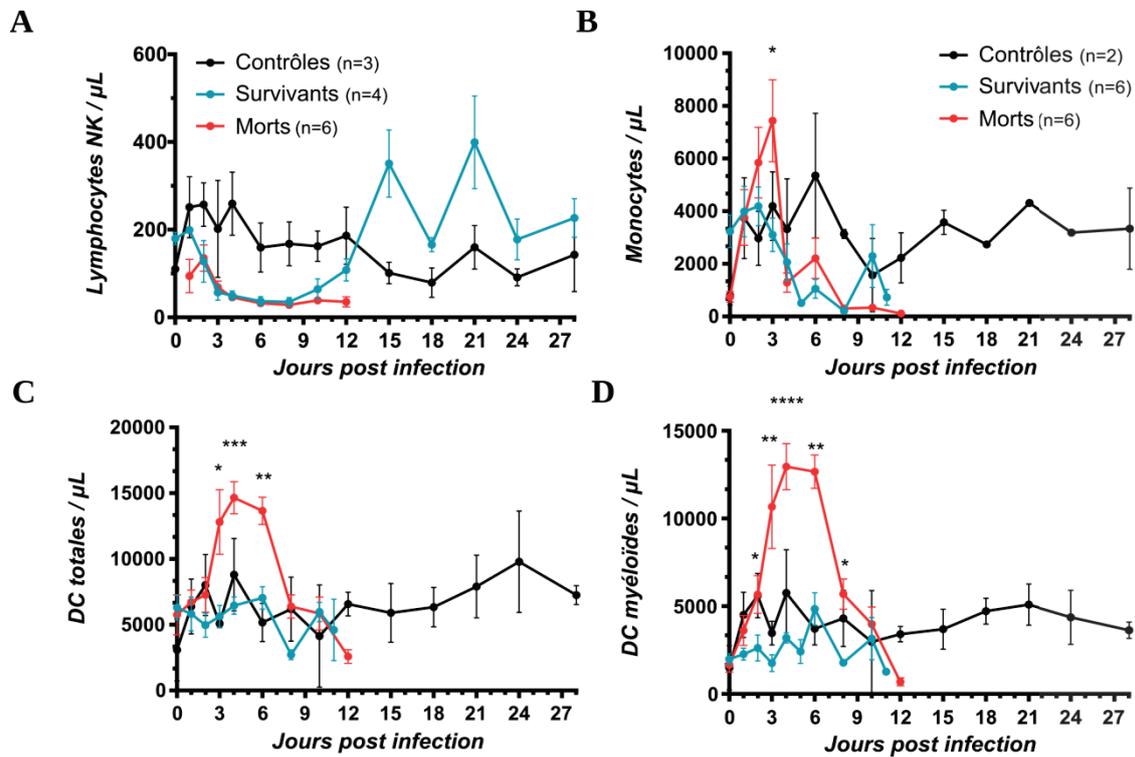


Figure 42 : Etude des populations immunitaires impliquées dans la réponse immunitaire innée. Les PBMC des animaux contrôles et des animaux infectés par une injection létale ou non du LASV ont été analysées par cytométrie en flux. Le comptage de cellules des cellules NK ($\text{CD}3\text{-CD}8\text{+CD}20\text{-}$), des monocytes ($\text{CD}45\text{+CD}14\text{+}$) des cellules dendritiques ($\text{CD}14\text{-HLA-DR+}$) et des cellules dendritiques myéloïdes ($\text{CD}14\text{-HLA-DR+CD}1\text{c+}$ et $\text{CD}14\text{-HLA-DR+CD}140\text{+}$) a été reporté au cours du temps en (A), (B), (C) et (D) respectivement. Les statistiques présentées correspondent à un *t*-test entre les moyennes des animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la maladie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

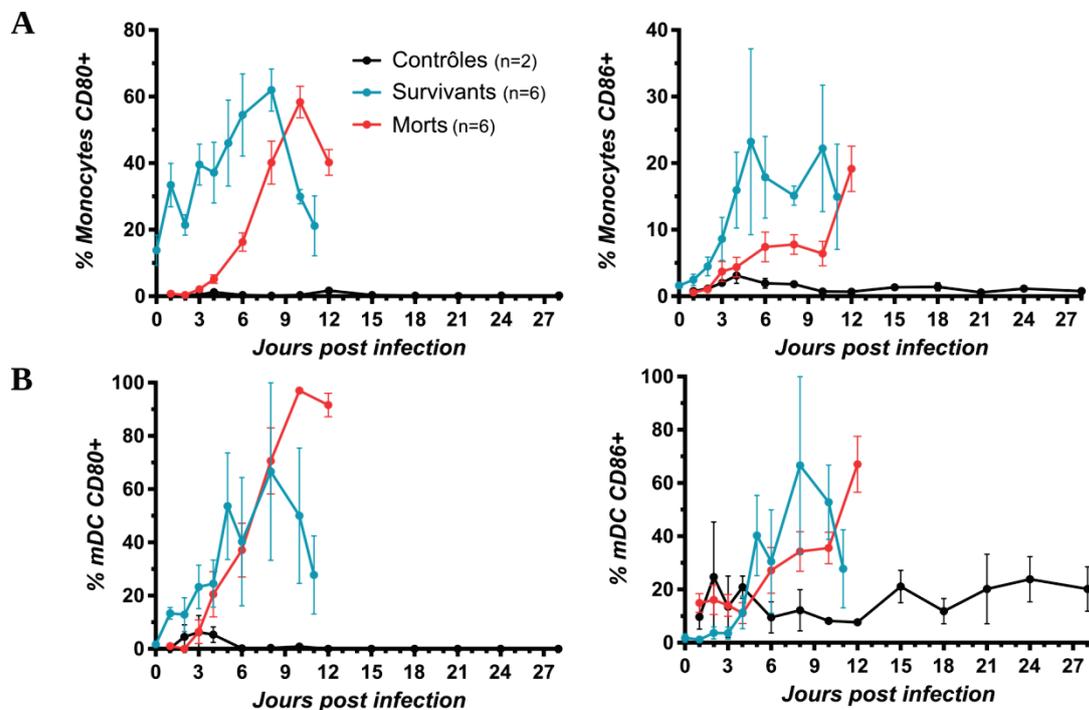


Figure 43 : Activation des monocytes et des cellules dendritiques au cours de la FL. Les monocytes et mDC exprimant les marqueurs CD80 ou CD86 ont été analysées par cytométrie en flux.

Les monocytes et les mDC sont de puissants médiateurs de l'inflammation en raison de leur rôle dans la sécrétion de cytokines inflammatoires. Nous nous sommes intéressés au profil des cytokines et des chimiokines sécrétées par les CPA dans le sang au cours des formes fatales ou non fatales de la maladie via la technologie Luminex. L'analyse des données a révélé une hausse importante de la concentration des chimiokines CCL2 et CCL4 à J8 post infection au cours des formes fatales (**Figure 44.A**). Une hausse bien plus modérée et transitoire de la concentration en CCL2 a été observée chez les survivants. Nous avons également observé un pic de sécrétion d'IL-8 transitoire dès le premier jour de l'infection chez les singes morts de la maladie tandis que ce pic de sécrétion était décalé et plus long dans le temps (entre J3 et J12 post infection) chez les survivants. De fortes concentrations de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12) et de facteurs impliqués dans l'induction de l'inflammation (GM-CSF, VEGF) ont été détectées uniquement au cours des formes fatales, atteignant un pic lors de la phase terminale de la maladie à J12 post infection (**Figure 44.B**). Un pic d'IFN- α a été détecté entre J4 et J8 post infection chez les deux cohortes, et à des taux similaires. Une élévation progressive de la concentration en IL-15 a également été observée entre J1 et J12 post infection chez tous les animaux infectés. La concentration en IL-15 est ensuite retombée à sa valeur seuil. Enfin, deux cytokines anti-inflammatoires ont été détectées dans le sang des animaux des deux cohortes, l'IL-1RA et l'IL-10. Leur hausse a été transitoire chez les survivants tandis qu'elle a augmenté de manière non contrôlée jusqu'à la mort des animaux infectés par la souche létale (**Figure 44.C**).

En conclusion, les monocytes et les mDC semblent jouer un rôle déterminant dans la réponse immunitaire au cours de la FL dans notre modèle. Bien que le nombre de mDC augmente uniquement au cours des phases précoces au cours de l'issue fatale, les mDC et les monocytes sont activés plus rapidement chez les animaux survivants. La production massive de chimiokines (CCL2, CCL4) et de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1RA, GM-CSF, VEGF), ou choc cytokinique est, quant à lui, spécifique des formes fatales de FL.

V.1.b. La réponse immunitaire adaptative T-CD4⁺ et T-CD8⁺

Plusieurs marqueurs ont été analysés par cytométrie en flux pour caractériser l'évolution, la prolifération, l'apoptose, l'activation, la fonction cytotoxique ainsi que la dysfonction des cellules immunitaires adaptatives T-CD4⁺ et T-CD8⁺. L'objectif est d'identifier les mécanismes immunitaires impliqués dans le contrôle de la maladie ou dans l'immunopathogénèse.

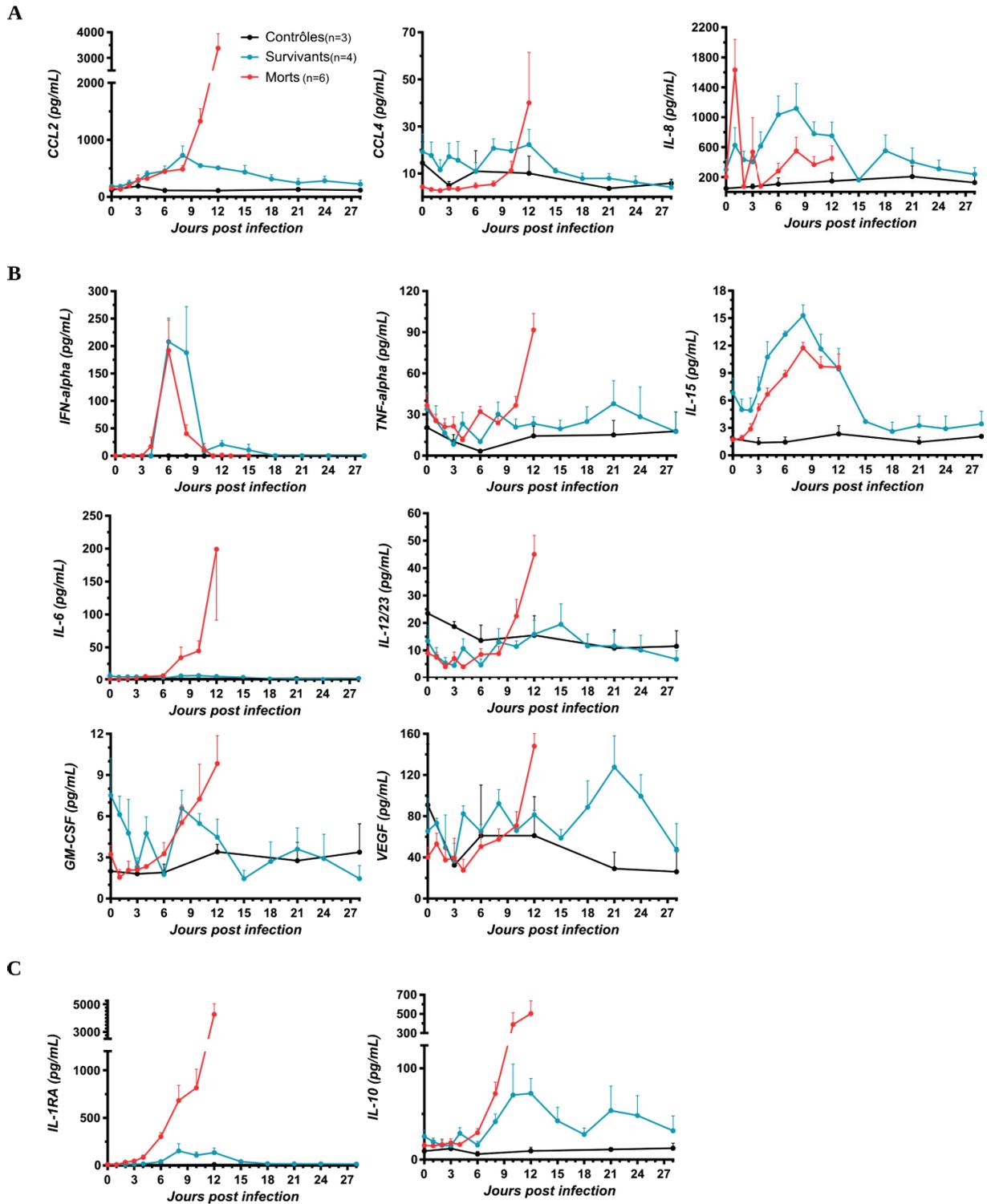


Figure 44 : Cinétique de sécrétion des cytokines et chimiokines sécrétées par les CPA au cours de l'infection. Les concentrations de CCL2, CCL4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α , TNF- α , GM-CSF, VEGF et IL-1RA ont été mesurées par Luminex dans le plasma des singes infectés ou non au cours de l'expérimentation. Les chimiokines ont été regroupées en (A), les cytokines et facteurs pro-inflammatoires en (B) et anti-inflammatoires en (C).

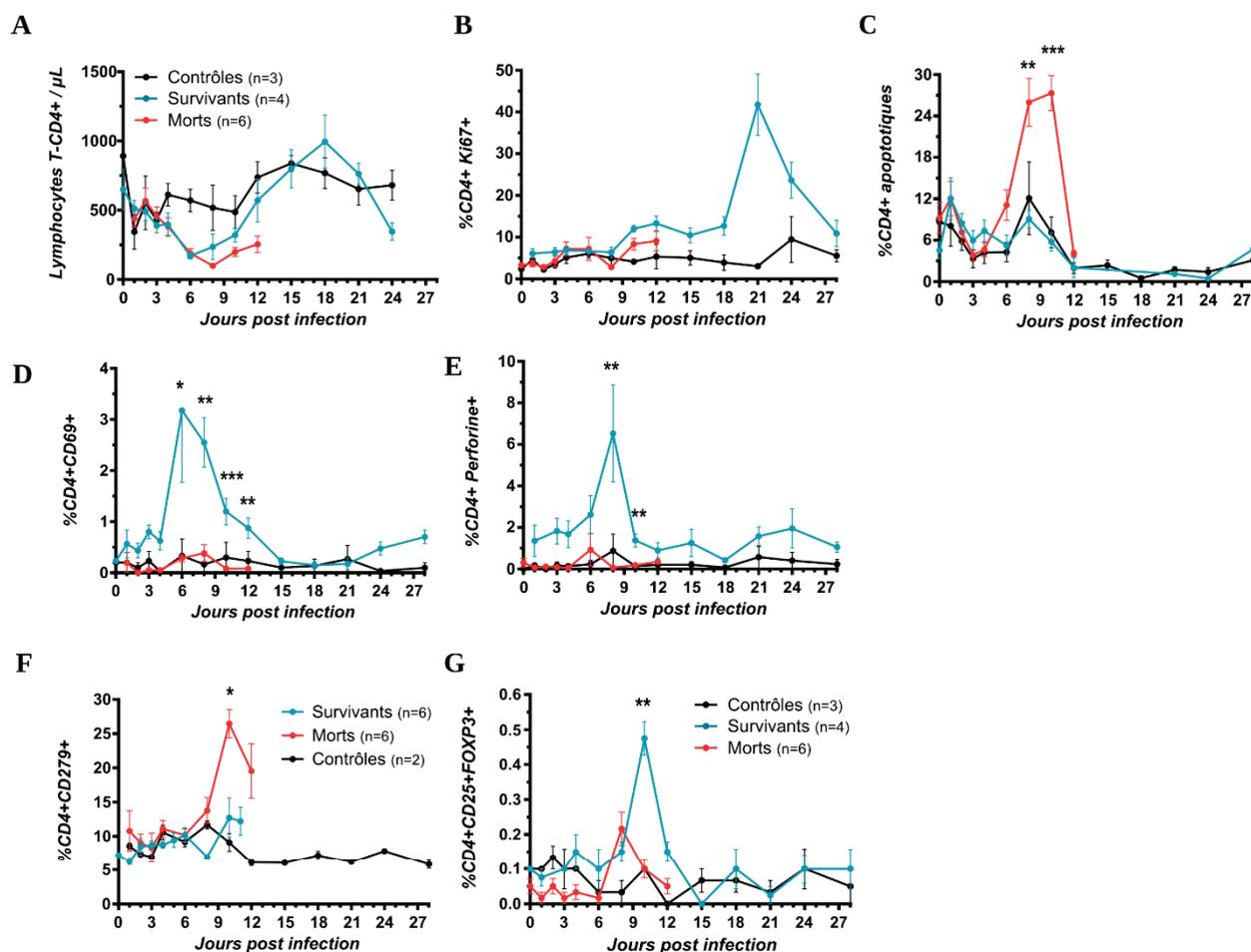


Figure 45 : Analyse de la réponse immunitaire T-CD4+ dans le sang au cours des différentes formes de FL. Les PBMC des animaux infectés ont été analysés par cytométrie en flux au cours du temps. (A) Comptage des lymphocytes T-CD4+ (CD3+ CD4+). (B) Pourcentage des T-CD4+ exprimant Ki67. (C) Pourcentage des cellules T-CD4+ apoptotiques (annexine V+ et 7AAD+/-). (D) Pourcentage des T-CD4+ exprimant CD69. (E) Pourcentage des cellules exprimant la perforine. (F) Pourcentage des T-CD4+ exprimant CD279. (G) Pourcentage des cellules T-CD4+ régulatrices (CD3+ CD4+ CD25+ FOXP3+). Les statistiques présentées correspondent à un *t*-test entre les moyennes des animaux ayant survécus et ceux ayant succombé à la maladie (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Nous avons observé une lymphopénie des lymphocytes T-CD4+ au cours des phases précoces de la maladie chez tous les animaux infectés. Cette lymphopénie a été suivie d'une lymphocytose dès J8 post infection chez les survivants (**Figure 45.A**). Une augmentation des cellules T-CD4+ exprimant le marqueur de prolifération Ki-67 a été observée chez les singes survivants à partir de J15 post infection (**Figure 45.B**). Aucune prolifération n'a été observée chez les animaux morts. Au contraire, une forte apoptose des cellules T-CD4+ a été identifiée uniquement chez ces animaux entre J6 et J10 post infection, caractérisée par l'expression positive des marqueurs annexine V et 7-AAD (**Figure 45.C**). Nous avons observé une augmentation du nombre de cellules T-CD4+ co-exprimant le marqueur CD69 entre J4 et J15 post infection chez les sur-

vivants, témoignant de l'activation de ces cellules. Aucune activation n'a été notée chez les animaux morts (**Figure 45.D**). Ces lymphocytes ont également montré une activité cytotoxique entre J6 et J10 post infection uniquement chez les animaux survivants, caractérisée par l'expression intracellulaire de la protéine cytolytique perforine (**Figure 45.E**). La proportion de cellules T-CD4⁺ anergiques, dites « épuisées » et définies par l'expression du récepteur PD-1 (CD279,) a augmenté de manière significative uniquement au cours des formes fatales de la maladie pendant la phase terminale (**Figure 45.F**). Enfin, une augmentation de la proportion des lymphocytes T-CD4⁺ régulateurs, caractérisés par l'expression de CD25 et FOXP3, a été observée uniquement pendant le pic de la maladie chez les animaux survivants (**Figure 45.G**). **Ces résultats soulignent qu'une réponse immunitaire T-CD4 robuste comprenant une prolifération des cellules, une activation précoce et l'acquisition de phénotypes cytotoxiques et régulateurs sont impliqués dans la survie du modèle. Au contraire, l'apoptose et l'épuisement de ces lymphocytes semblent être associés à l'issue fatale.**

Une lymphopénie des lymphocytes T-CD8⁺ a également été observée au cours de la phase précoce des formes fatales et non fatales de la maladie (**Figure 46.A**). Cette lymphopénie est suivie par une forte lymphocytose chez les survivants, apparaissant au pic de la maladie et s'étalant jusqu'à la fin de l'expérimentation. Aucune augmentation du nombre de cellules T-CD8⁺ n'a été enregistrée chez les animaux morts de la maladie. Les cellules T-CD8⁺ ont proliféré dès J8 post infection et jusqu'à la fin de l'expérimentation chez les survivants tandis qu'aucune prolifération n'a été enregistrée au cours de l'issue fatale (**Figure 46.B**). Nous avons également observé une augmentation significative de la proportion de lymphocytes T-CD8⁺ apoptotiques, et ce, uniquement au cours de l'issue fatale (**Figure 46.C**). Nous avons noté une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation CD69 et CD95 à la surface des cellules T-CD8⁺, et ce, au cours des deux issues de la maladie (**Figure 46.D**). Cependant, CD69 a été co-exprimé par ces lymphocytes au cours d'un intervalle de temps plus important chez les survivants par rapport aux animaux moribonds. Il a été noté une forte activité cytotoxique de ces lymphocytes, montrée par l'expression de perforine et de granzyme B, uniquement au cours de l'issue non fatale (**Figure 46.E**). Les cellules T-CD8 de ces animaux ont exprimé la perforine au cours des phases tardives de la maladie, pendant la disparition des symptômes, tandis que l'expression du granzyme B a augmenté à partir de J6, atteignant un pic à J15, avant de diminuer jusqu'à la fin de l'expérimentation. Enfin, nous avons observé une augmentation plus importante de la proportion de cellules T-CD8⁺ anergiques au cours de l'issue fatale par rapport à l'issue non fatale (**Figure 46.F**).

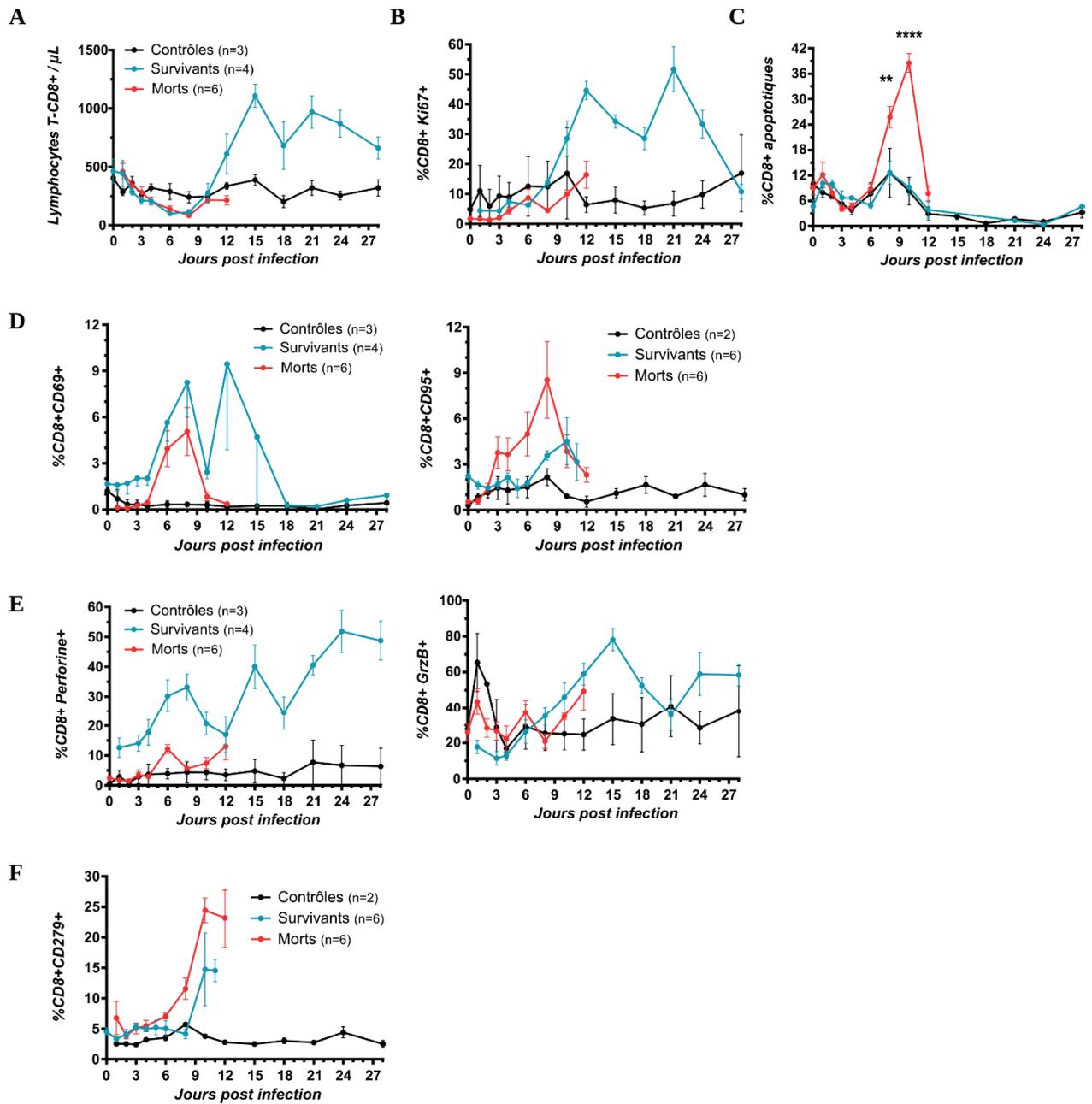


Figure 46 : Analyse de la réponse immunitaire T-CD8+ dans le sang au cours des différentes formes de FL. Les PBMC des animaux infectés ont été analysés par cytométrie en flux au cours du temps. (A) Comptage des lymphocytes T-CD8+ (CD3+ CD8+). (B) Pourcentage des T-CD8+ exprimant Ki67. (C) Pourcentage des cellules T-CD8+ apoptotiques (annexine V+ et 7AAD+/-). (D) Pourcentage des T-CD8+ exprimant CD69 ou CD95. (E) Pourcentage des cellules exprimant perforine ou granzyme B. (F) Pourcentage des T-CD8+ exprimant CD279. Les statistiques présentées correspondent à un *t*-test entre les moyennes des animaux ayant survécus et ceux ayant succombé à la maladie (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Ces résultats montrent que la réponse cytotoxique T-CD8⁺ est également impliquée dans le contrôle de la maladie. En effet, il a été observé chez ces cellules une forte prolifération, une activation précoce et l'acquisition d'un rôle cytotoxique chez les survivants. Au contraire et au même titre que les lymphocytes T-CD4⁺, l'apoptose et l'épuisement des lymphocytes T-CD8⁺ semblent être associés à l'issue fatale.

Afin de caractériser plus finement la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T, nous nous sommes intéressés au profil des cytokines et autres protéines sécrétées par ces populations immunitaires. Nous avons observé une augmentation progressive de la concentration en perforine dans le sang des animaux au cours des deux issues de la maladie, avec un pic à J12 post infection (**Figure 47.A**). Cependant, nous avons noté une forte augmentation de la concentration de la protéine cytolytique granzyme B, spécifique des lymphocytes T-CD8⁺, uniquement dans le sang des animaux survivants. Les formes solubles de CD137 (sCD137) et de CD40 ligand (sCD40-L), sécrétées par les lymphocytes T activés, ont vu leur concentration augmenter dans le plasma des animaux des deux cohortes (**Figure 47.B**). La concentration de sCD137 a augmenté à partir de J8 post infection chez les animaux infectés pour atteindre un pic à J12 post infection. Ce pic de sécrétion a ensuite diminué chez les animaux survivants. Le pic de sécrétion de sCD40-L était plus tardif et plus durable au cours de l'issue fatale. Nous nous sommes ensuite intéressés aux cytokines impliquées dans la réponse Th1 (IFN- γ et IL-2) ou Th2 (IL-5) (**Figure 47.C**). L'IFN- γ a été sécrété entre J3 et J15 post infection, atteignant un pic de concentration à J8 post infection, et ce, chez tous les singes infectés. Cependant, de fortes concentrations en IL-2 n'ont été observées que dans le plasma des animaux morts de la maladie. Enfin, nous avons noté la présence d'IL-5 uniquement dans le plasma des animaux survivants. **En conclusion, la forte sécrétion de granzyme B semble être associée à la survie dans notre modèle. Ces résultats suggèrent également qu'un nombre important de cytokines sécrétées par les lymphocytes T (TNF- α , IFN- γ , IL-2 et IL-10) sont retrouvées dans le plasma des animaux développant une issue fatale de la maladie. Au contraire, l'IL-5, impliquée dans la réponse Th2, semble être associée au contrôle de la maladie.**

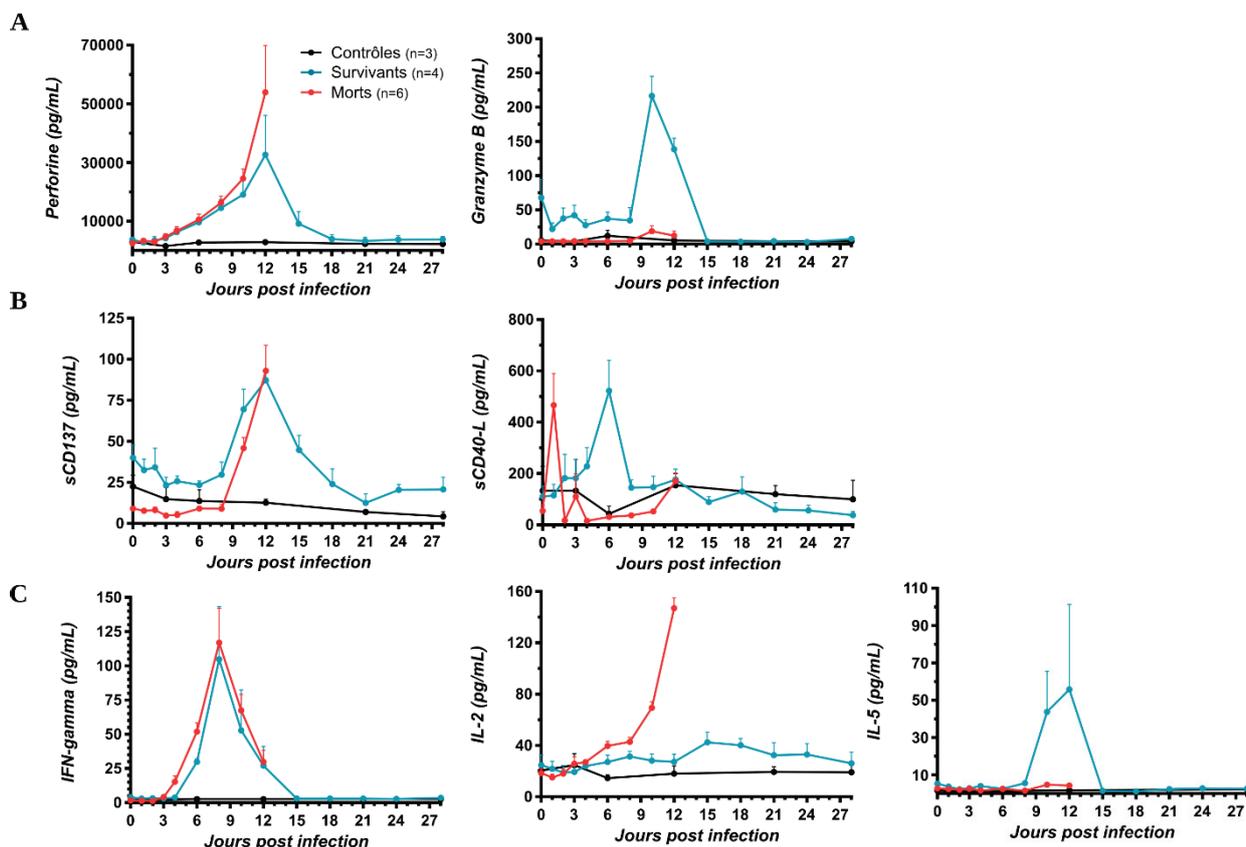


Figure 47 : Profil de sécrétion des cytokines lymphocytaires au cours de l'infection. Les concentrations des cytokines indiquées ont été mesurées par Luminex dans le plasma des singes infectés ou non au cours de l'expérimentation. Les protéines cytolytiques sont regroupées en (A). Des médiateurs de l'activation des cellules T sont regroupés en (B). Les cytokines impliquées dans la réponse Th1 (IFN- γ , IL-2) et Th2 (IL-5) sont regroupées en (C).

V.1.c. La réponse mémoire des T-CD4+ et T-CD8+

Nous nous sommes intéressés à la réponse mémoire T en se focalisant sur trois marqueurs : CD45RA, CD27 et CD28. Ces marqueurs permettent la différenciation dans la population T-CD4+ des lymphocytes naïfs (CD4+ CD45RA+ CD27+ CD28+), centrales mémoires (CD4+ CD45RA- CD27+ CD28+), effecteurs mémoires (CD4+ CD45RA- CD27- CD28+) et effecteurs (CD4+ CD45RA- CD27- CD28-). Ces marqueurs permettent également de mettre en évidence la différenciation des lymphocytes T-CD8+ naïfs (CD8+ CD45RA+ CD27+ CD28+), centrales mémoires (CD8+ CD45RA- CD27+ CD28+), intermédiaires (CD8+ CD45RA- CD27+ CD28-), tardifs (CD8+ CD45RA- CD27- CD28-) et effecteurs (CD8+ CD45RA+ CD27- CD28-) ^[304-306].

Nous n'avons pas observé de fortes variations dans les différentes populations de lymphocytes T-CD4⁺ au cours du temps chez les animaux contrôles hormis pour la population centrale mémoire qui fluctue légèrement en fonction du temps, ce qui peut être expliqué par le faible nombre d'échantillons contrôles (2 pour cette étude) (**Figure 48.A**). De manière similaire, il a été identifié une augmentation de la proportion des cellules T-CD4⁺ centrales mémoires entre J2 et J10 post infection au cours de l'issue fatale. Cette augmentation des T-CD4⁺ centrales mémoires a été plus modérée chez les animaux survivants. En revanche, nous avons noté l'apparition de cellules T-CD4⁺ différenciées en effecteurs mémoires et en effecteurs entre J6 et J8 post infection. Cette particularité n'a été observée qu'au cours de l'issue non fatale.

Une augmentation de la proportion de lymphocytes T-CD8⁺ centrales mémoires et intermédiaires a été observée entre J10 et J12 post infection au cours des deux issues de la maladie (**Figure 48.B**). Une augmentation du pourcentage de cellules T-CD8⁺ effectrices a été observée uniquement entre J6 et J8 post infection chez les animaux morts de la maladie.

Ces données semblent suggérer que l'augmentation de la proportion de lymphocytes T-CD4⁺ effecteurs pendant les phases précoces joue un rôle dans le contrôle de la maladie. Au contraire, l'augmentation de la proportion de cellules T-CD8⁺ effectrices ont été observées pendant la même période au cours de l'issue fatale. Une différence dans la population de lymphocytes T mémoires pourrait donc être impliquée dans la sévérité de la maladie.

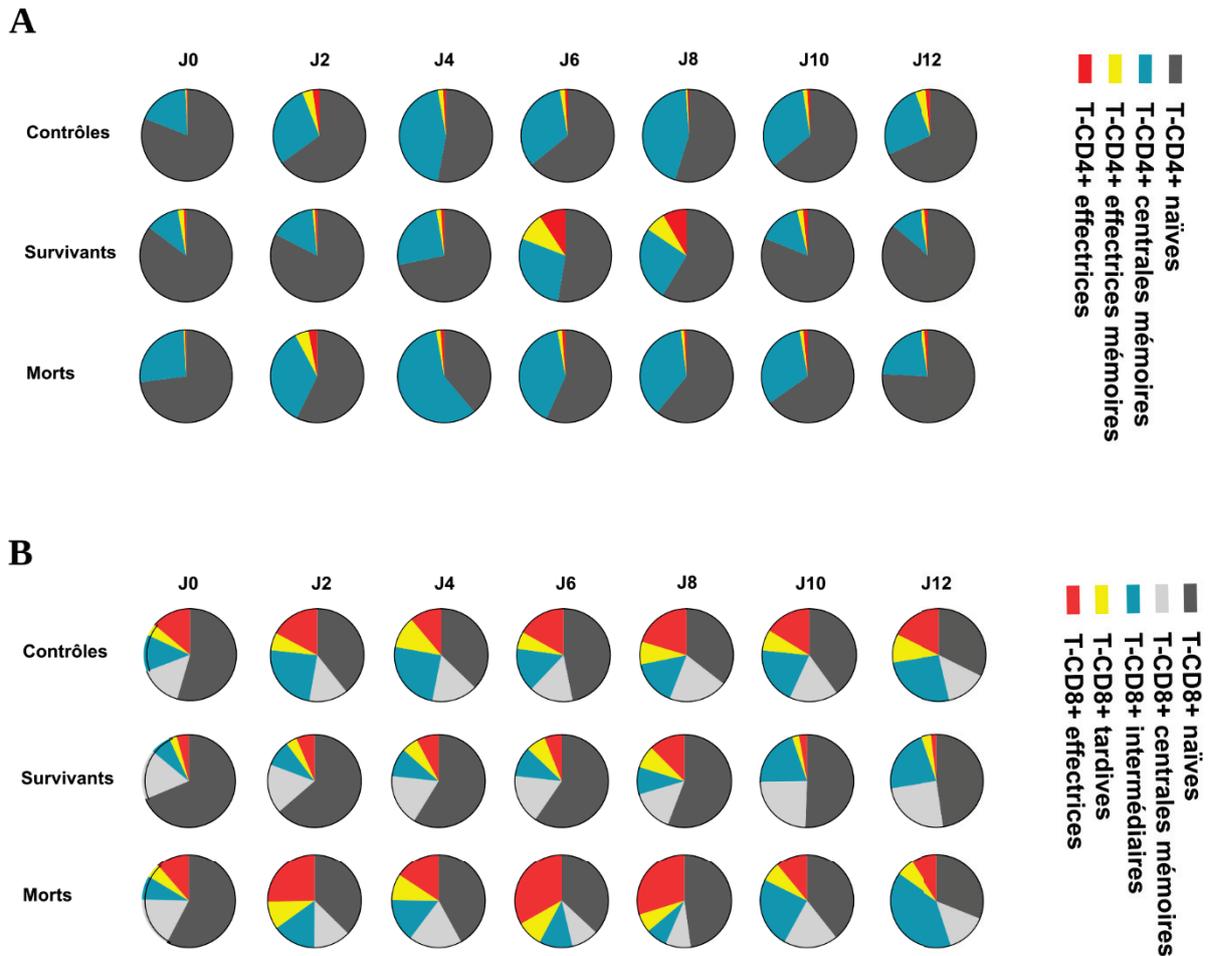


Figure 48 : Caractérisation des populations lymphocytaires mémoires au cours de l'infection. Les PBMC de 2 animaux contrôles, 6 animaux infectés par LASV Josiah et 3 animaux infectés par LASV AV ont été analysés par cytométrie en flux au cours du temps. (A) Les proportions des cellules T-CD4+ naïfs (CD4+ CD45RA+ CD27+ CD28+), centrales mémoires (CD4+ CD45RA- CD27+ CD28+), effecteurs mémoires (CD4+ CD45RA- CD27- CD28+) et effecteurs (CD4+ CD45RA- CD27- CD28-) ont été reportées sous forme de camemberts. (B) Les proportions des cellules T-CD8+ naïfs (CD8+ CD45RA+ CD27+ CD28+), centrales mémoires (CD8+ CD45RA- CD27+ CD28+), intermédiaires (CD8+ CD45RA- CD27+ CD28-), tardifs (CD8+ CD45RA- CD27- CD28-) et effecteurs (CD8+ CD45RA+ CD27- CD28-) ont également été reportées.

V.1.d. La réponse cellulaire B et la sécrétion d'anticorps

A l'instar des populations lymphocytaires T analysées jusqu'ici, nous avons identifié une lymphopénie transitoire des lymphocytes B dans le sang des animaux infectés. Alors qu'aucune lymphocytose n'a été observée au cours de l'issue fatale, celle-ci est apparue à partir de J12 post infection chez les animaux survivants (Figure 49.A). Le pourcentage de cellules B exprimant les marqueurs de costimulation CD80 et CD86 a augmenté au cours des phases tardives uniquement chez les animaux survivants, témoignant d'une activation des lymphocytes B.

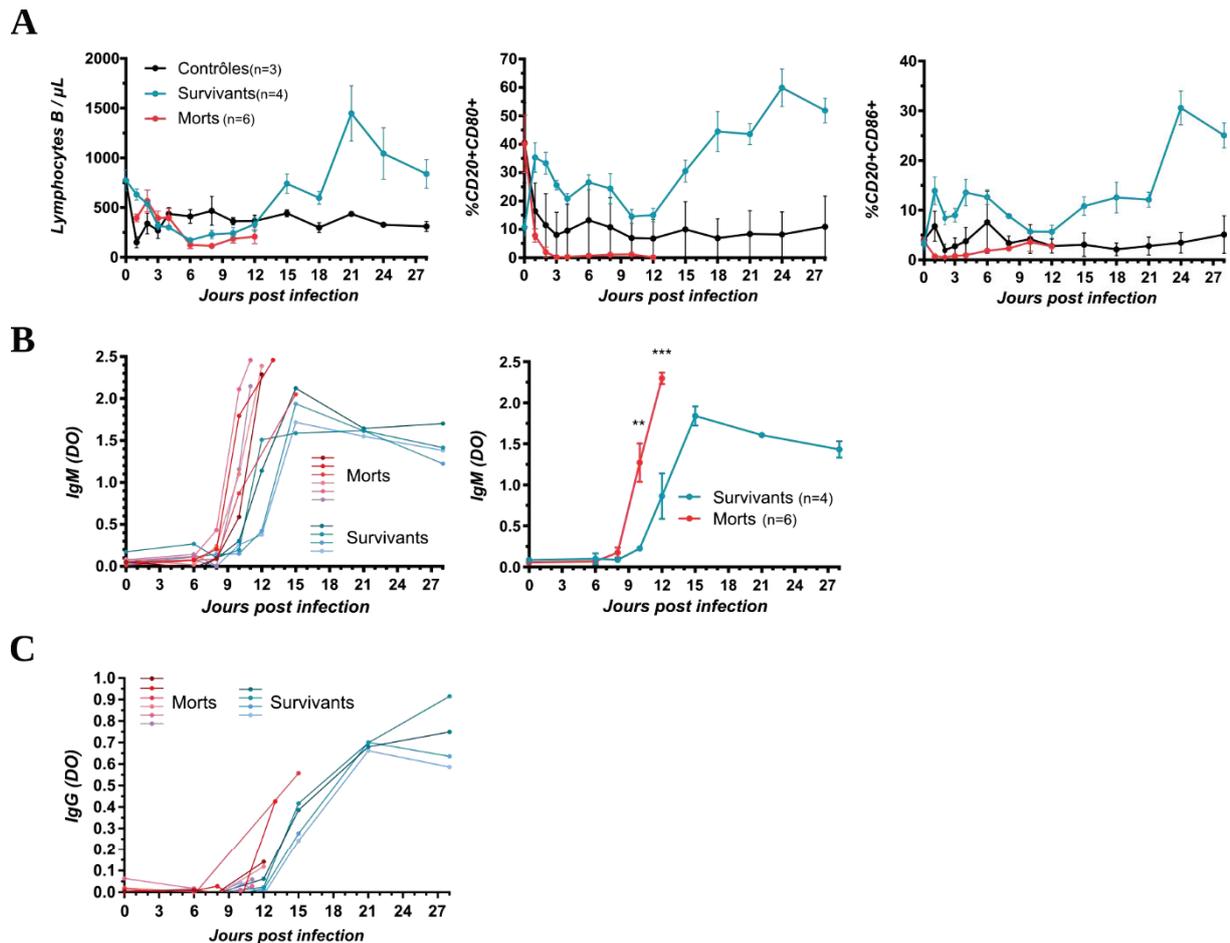


Figure 49 : Caractérisation de la réponse cellulaire B et de la réponse humorale. (A) Les PBMC des animaux ont été analysés par cytométrie en flux au cours du temps et le comptage des lymphocytes B (CD20+) ainsi que leur activation (CD80 et CD86) ont été rapportés. (B et C) Les IgM (B) et IgG (C) spécifiques de LASV ont été détectés par ELISA dans le plasma des animaux collectés au cours du temps. Les résultats sont exprimés en densité optique (DO). Les plasmas ont été dilués au 100^e pour les IgM et au 1000^e pour les IgG. Le graphe de droite en (B) correspond aux moyennes des individus. Les statistiques présentées correspondent à un *t*-test entre les moyennes des animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la maladie (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Des anticorps IgM spécifiques du LASV ont été détectés dans le plasma de tous les singes infectés, peu importe l'issue de la maladie (**Figure 49.B**). Ces IgM ont été détectés dès J8 post infection au cours de l'issue fatale et dès J10 post infection chez les survivants. La quantité d'anticorps IgM détectés était significativement plus importante chez les animaux moribonds alors que celle-ci a rapidement atteint un plateau autour de J15 post infection chez les survivants. Les anticorps IgG spécifiques du LASV ont été détectés plus tardivement : dès J12 post infection au cours de l'issue fatale et dès J15 chez les survivants (**Figure 49.C**). **En conclusion, l'activation de la réponse B dans le sang n'est observée que chez les survivants. Ce-**

pendant la réponse humorale est induite plus précocement chez les animaux moribonds. La réponse humorale seule n'est donc pas associée au contrôle de la maladie.

V.2. Réponses immunitaires dans les organes lymphoïdes secondaires

Les organes lymphoïdes jouent un rôle important dans la genèse de la réponse immunitaire adaptative. Les euthanasies séquentielles des animaux infectés par les souches AV ou Josiah du LASV ont permis l'analyse par cytométrie en flux des cellules extraites de la rate et de deux types de ganglions : les ganglions inguinaux (GGI), proche du site d'infection, et les ganglions mésentériques (GGM). La prolifération, l'activation, l'acquisition de cytotoxicité, l'inhibition et l'apoptose des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ dans ces organes ont été étudiées au cours de l'issue fatale ou non fatale et à différents temps au cours de la maladie (J2, J5, J11 et J28 post infection). L'analyse de la population lymphocytaire B a également été étudiée.

V.2.a. *Prolifération des lymphocytes T*

L'analyse de la population des lymphocytes T-CD8⁺ a montré une augmentation significative du pourcentage de cellules prolifératives, exprimant Ki67⁺, au moment du pic de la maladie (J11 post infection) et ce, dans la rate, les GGI et les GGM au cours des deux issues de la maladie (**Figure 50.A**). Cette prolifération a été plus importante dans les deux types de ganglions chez les animaux survivants. De plus, nous avons observé une légère augmentation de la proportion de cellules T-CD8⁺ prolifératives dans les ganglions à J5 post infection chez les survivants alors que cette population n'a pas augmenté chez les animaux morts de la maladie. Cette observation suggère que la prolifération a été plus précoce dans les ganglions au cours de l'issue non fatale. Par ailleurs, le pourcentage de cellules T-CD8⁺ prolifératives était toujours élevé dans les trois organes lymphoïdes au cours de la guérison des animaux (J28 post infection). Les mêmes phénomènes ont été observés pour les lymphocytes T-CD4⁺ avec une forte prolifération générale dans la rate, les GGI et les GGM à J11 post infection chez tous les animaux ; une proportion plus importante dans les ganglions chez les survivants à J11 post infection ; une augmentation de cette population dès J5 post infection uniquement chez les survivants et un maintien de celle-ci à J28 post infection (**Figure 50.B**). **En résumé, nous avons observé une prolifération importante des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺, initiée dès J5 post infection dans les organes lymphoïdes chez les animaux survivants. Cette**

même réponse a été moins importante et plus tardive dans les ganglions chez les animaux morts de maladie.

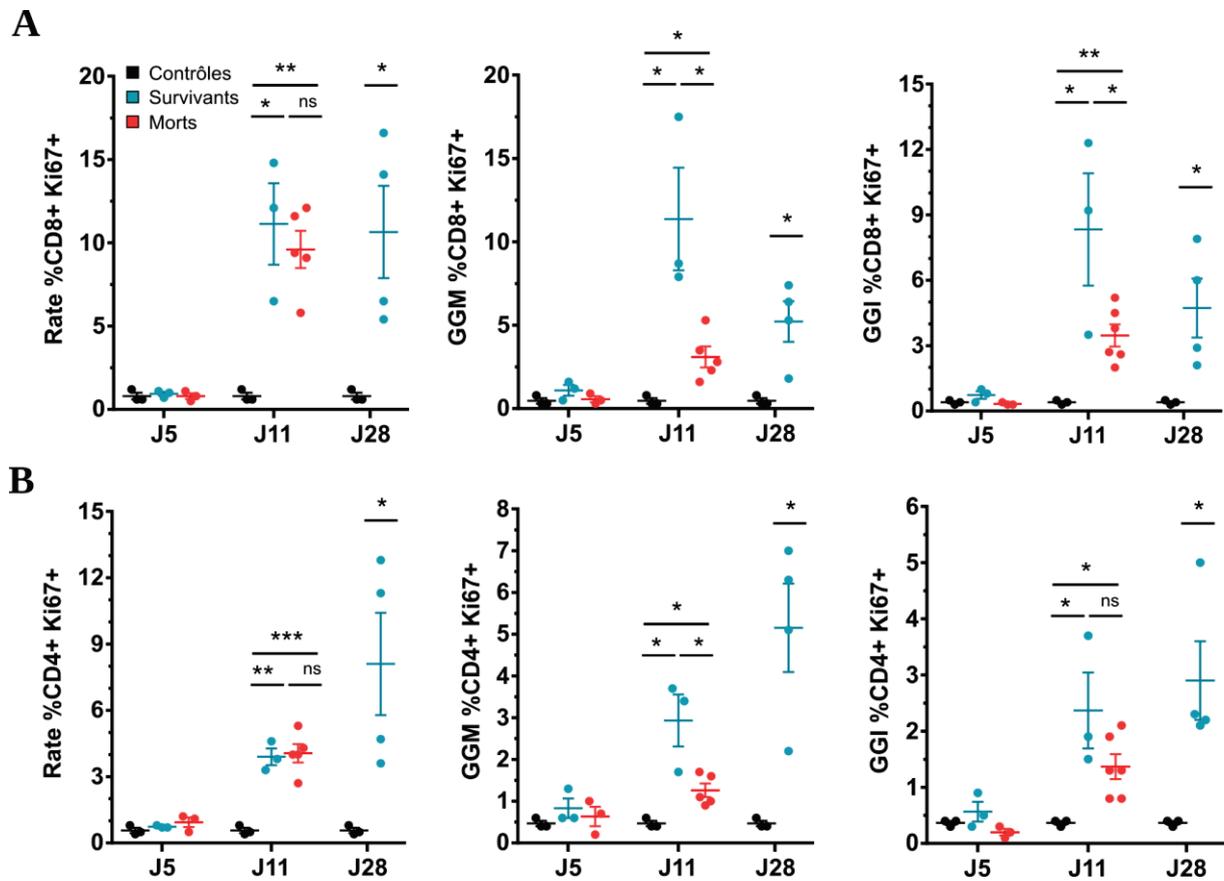


Figure 50 : Prolifération des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions méésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J5, J11 et J28 post infection). La prolifération des cellules T-CD8+ (CD3+ CD8+ Ki67+) et T-CD4+ (CD3+ CD4+ Ki67+) a été analysée par cytométrie en flux en (A) et (B) respectivement. Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=3 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J5, J11 et J28 : n = 3, 3 et 4 respectivement ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J5 et J11 : n = 3 et 6 respectivement. Les tests statistiques présentés correspondent à un test de Student entre les groupes indiqués (ns non significatif ; * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001).

V.2.b. Activation des lymphocytes T

Bien que les données ne soient pas statistiquement significatives en raison d'une variation interindividuelle importante dans les différents groupes, nous avons noté une augmentation précoce du pourcentage de cellules T-CD4+CD69+ à J2 et à J28 post infection dans la rate des animaux survivants, témoin de l'activation des cellules T-CD4+ (**Figure 51.A**). Cette expression de CD69 est apparue plus tardivement (J5 post infection) dans la rate des animaux

morts de la maladie. Nous avons également observé dans les ganglions une légère augmentation de la proportion de cellules T-CD4+CD69+ à J2 et J5 post infection chez les animaux survivants et dans une moindre mesure chez les animaux morts de la maladie. Nous avons observé dans la rate une augmentation du pourcentage de cellules T-CD8+CD69+ uniquement chez les animaux survivants à J2, J5 et J28 post infection (**Figure 51.B**). Nous avons également noté une légère augmentation de la proportion de cellules T-CD8+CD69+ à J2 et J5 post infection dans les ganglions des animaux survivants, et dans une moindre mesure dans les ganglions des animaux morts de la maladie. De manière intéressante, le pourcentage de cellules T-CD8+ matures, exprimant le marqueur CD95, a augmenté uniquement chez les animaux survivants au cours des étapes tardives de la maladie (J11 et J28 post infection), et ce, dans les trois organes lymphoïdes analysés (**Figure 51.C**). **Ces résultats semblent montrer un profil d'activation différent des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ en fonction du type d'organe lymphoïde. Cette activation semble de manière générale plus marquée au cours de l'issue non fatale. Enfin, la présence de cellules T-CD8+ matures a été identifiée uniquement chez les survivants.**

V.2.a. *Cytotoxicité des lymphocytes T*

Nous avons observé que le pourcentage de cellules T-CD8+ cytotoxiques, caractérisées par l'expression intracellulaire de granzyme B ou de perforine, augmentait à J11 post infection dans la rate des animaux infectés. Les lymphocytes T-CD4+GrzB+ de la rate ont semblé augmenter uniquement chez les animaux survivants, bien que la forte variation au sein des échantillons n'ait pas permis d'obtenir des résultats significatifs (**Figure 52.A**). Nous avons également observé dans les GGM (**Figure 52.B**) et les GGI (**Figure 52.C**) une augmentation statistiquement significative du pourcentage de cellules T-CD8+GrzB+, T-CD8+Perfo+ et T-CD4+GrzB+ à J11 post infection au cours de l'infection par LASV, létale ou non létale. Cependant, cette hausse a été significativement plus importante chez les animaux survivants et était toujours observable à des phases tardives de l'infection (J28). **En résumé, une forte activité cytotoxique, exprimée principalement par les cellules T-CD8+, et dans une moindre mesure par les cellules T-CD4+, a été observée chez les animaux survivants dans tous les organes lymphoïdes. Cette même réponse était plus faible au cours de l'issue fatale.**

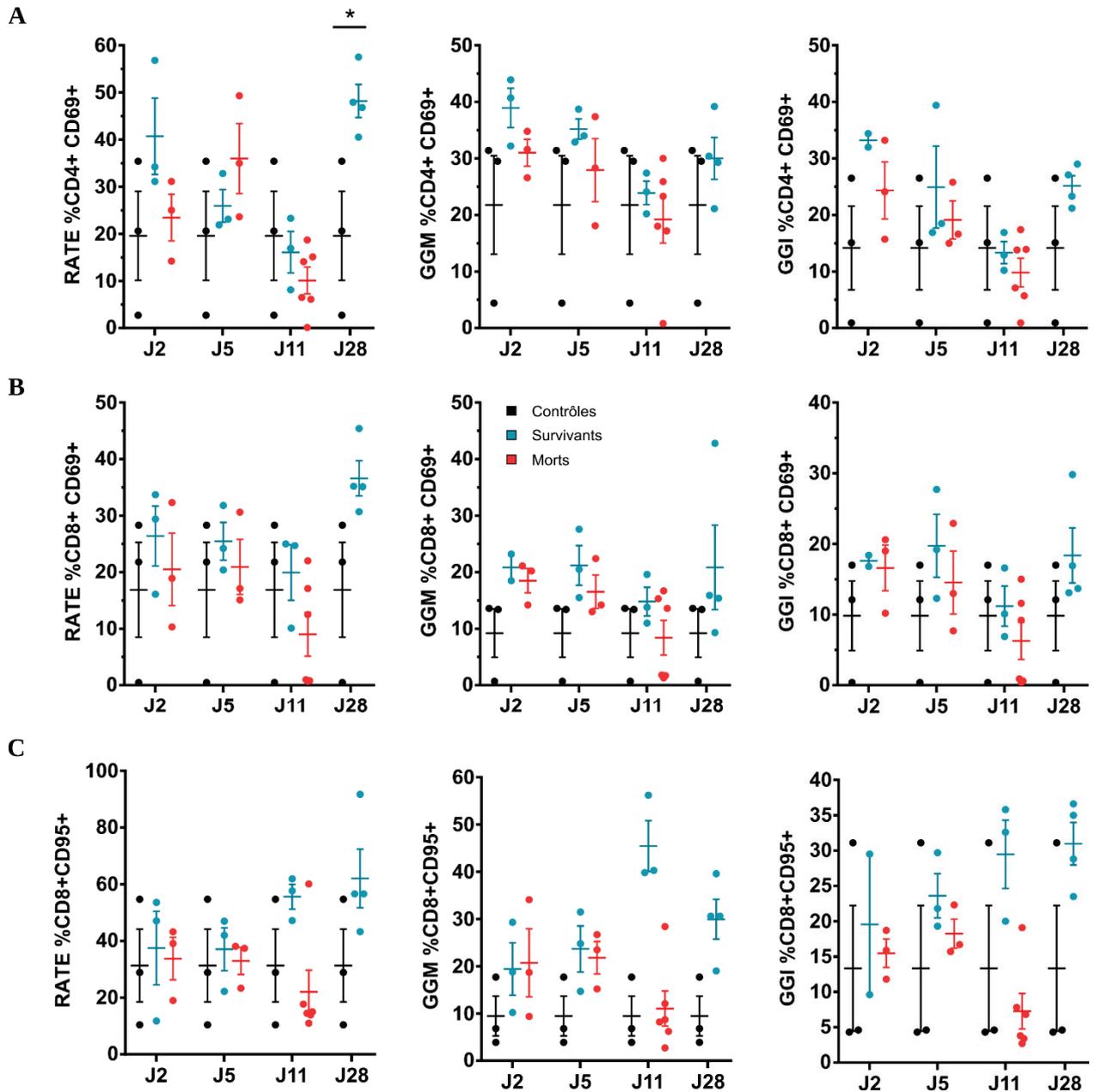


Figure 51 : Activation des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions mésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J2, J5, J11 et J28 post infection). L'activation des cellules T-CD4+ (CD3+ CD4+ CD69+) et T-CD8+ (CD3+ CD8+ CD69+ ou CD95+) a été analysée par cytométrie en flux en (A), (B) et (C) respectivement. Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=3 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J2, J5, J11 et J28 : n = 3, 3, 3 et 4 respectivement ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J2, J5 et J11 : n = 3, 3 et 6 respectivement. Les tests statistiques présentés correspondent à un test de Student entre les groupes indiqués (* p<0.05).

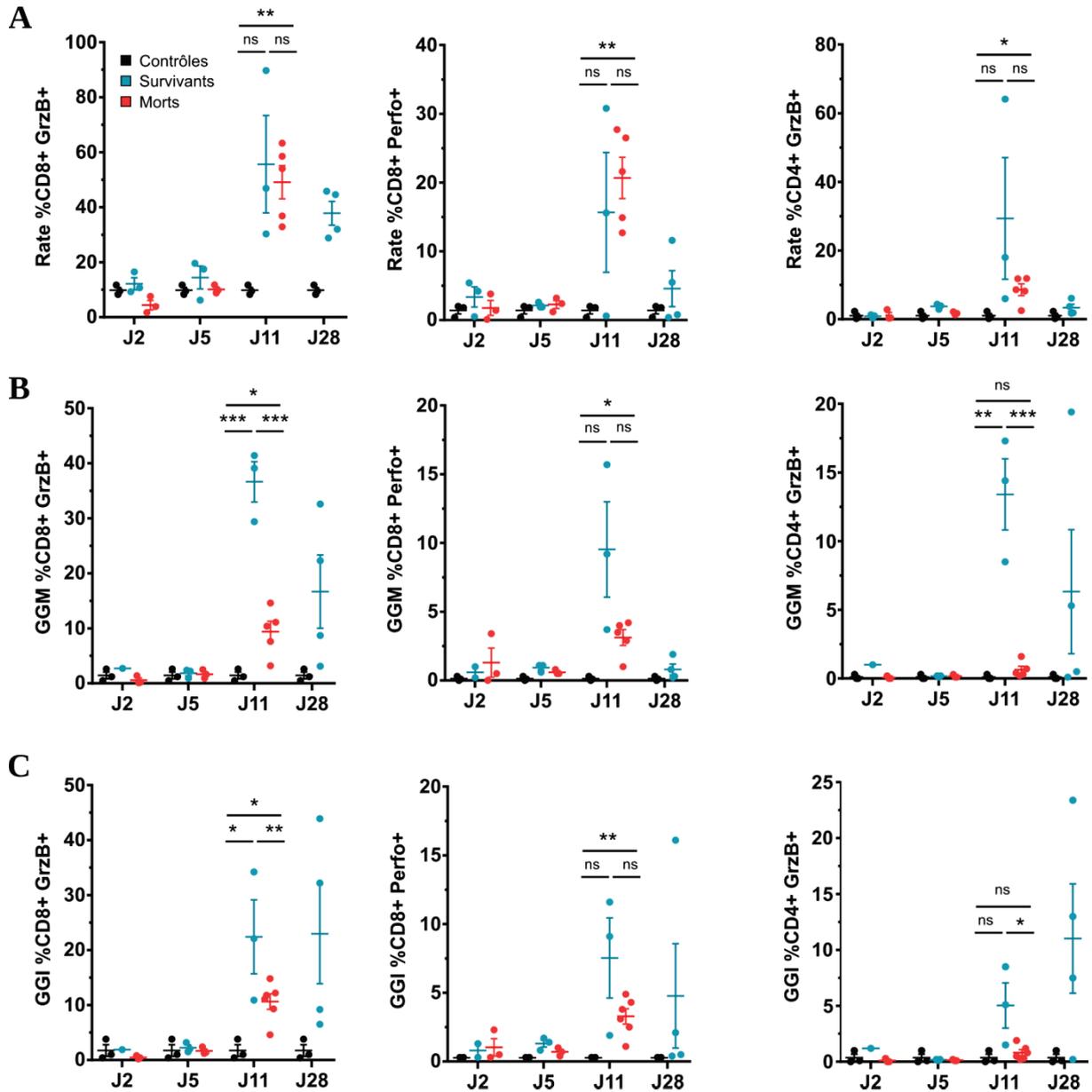


Figure 52 : Cytotoxicité des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions mésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J2, J5, J11 et J28 post infection). La cytotoxicité des lymphocytes T-CD8+ et T-CD4+ a été analysée par cytométrie en flux dans la rate (A), les GGM (B) et les GGI (C). Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=3; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J2, J5, J11 et J28 : n = 3, 3, 3 et 4 respectivement ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J2, J5 et J11 : n = 3, 3 et 6 respectivement. Les tests statistiques présentés correspondent à un test de Student entre les groupes indiqués (ns non significatif ; * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001).

V.2.b. Inhibition de la fonction des lymphocytes T

L'inhibition de la fonction des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ a été mesurée, via l'expression du marqueur CD279 (PD-1), dans la rate, les GGI et les GGM des animaux infectés. Nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules T-CD4+CD279+ uniquement à J5 post infection dans la rate au cours de l'issue fatale de la maladie (**Figure 53.A**). Cependant, nous avons noté une augmentation de la proportion de cellules T-CD8+ CD279+ dans les trois organes lymphoïdes testés à J11 post infection au cours de l'issue fatale ou non fatale (**Figure 53.B**). **L'infection par LASV entraîne donc une hausse des lymphocytes, principalement les T-CD8+, exprimant CD279 dans les organes lymphoïdes secondaires, quelle que soit la sévérité de la maladie rencontrée.**

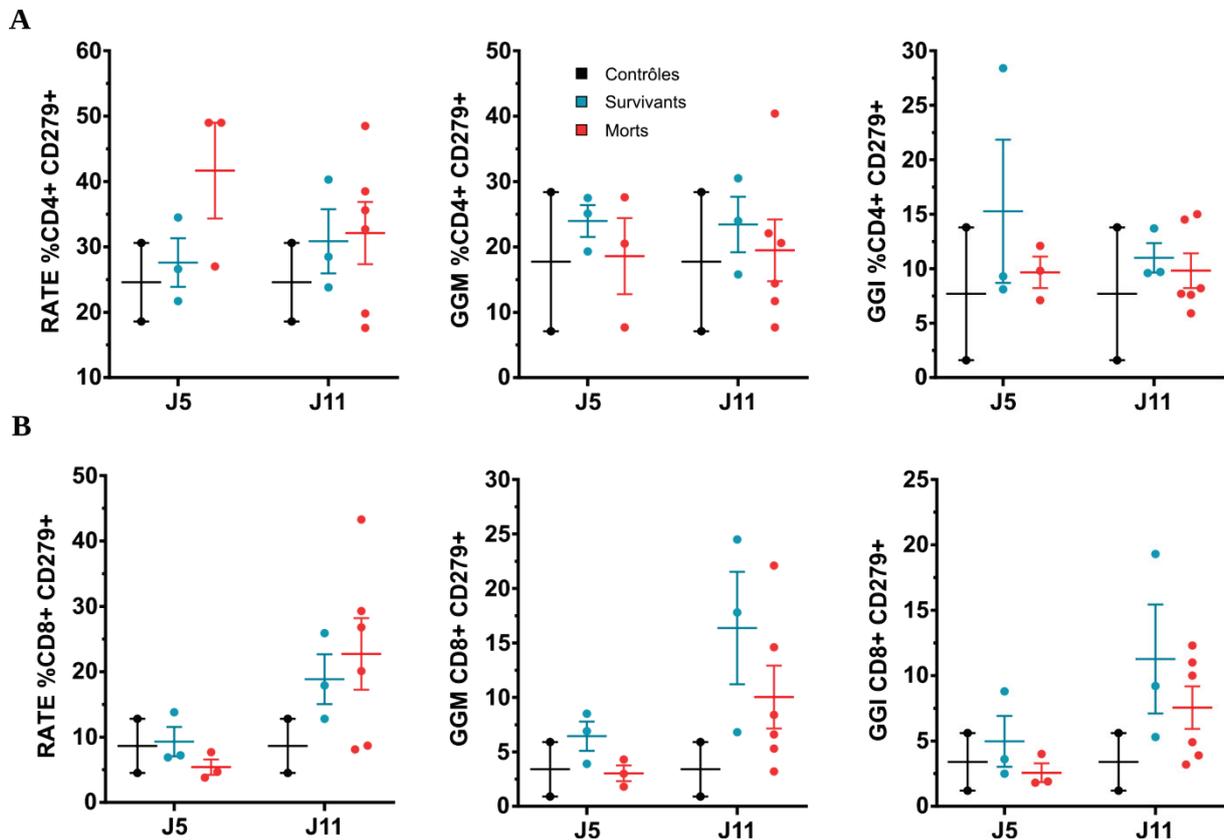


Figure 53 : Inhibition des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions méésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J5 et J11 post infection). A partir de ces broyats d'organes, la cytotoxicité des lymphocytes T-CD8+ et T-CD4+ a été analysée par cytométrie en flux en (A) et (B), respectivement. Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=2 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J5 et J11 : n = 3 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J5 et J11 : n = 3 et 6 respectivement.

V.2.c. Apoptose des lymphocytes T

La proportion de cellules T-CD4+ apoptotiques a augmenté à J5 et à J11 post infection dans la rate et les ganglions des animaux infectés, quelle que soit l'issue de la maladie (**Figure 54.A**). Cependant, cette augmentation est significativement plus importante chez les animaux survivants par rapport aux animaux morts de la maladie. La même observation a été faite concernant les lymphocytes T-CD8+ apoptotiques, dont le nombre a augmenté à J2 et à J5 post infection dans la rate et les ganglions des animaux infectés, et dont l'augmentation a été significativement plus importante chez les animaux survivants (**Figure 54.B**). **En conclusion, nous avons observé une apoptose précoce des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ plus importante dans les organes lymphoïdes chez les animaux survivants.**

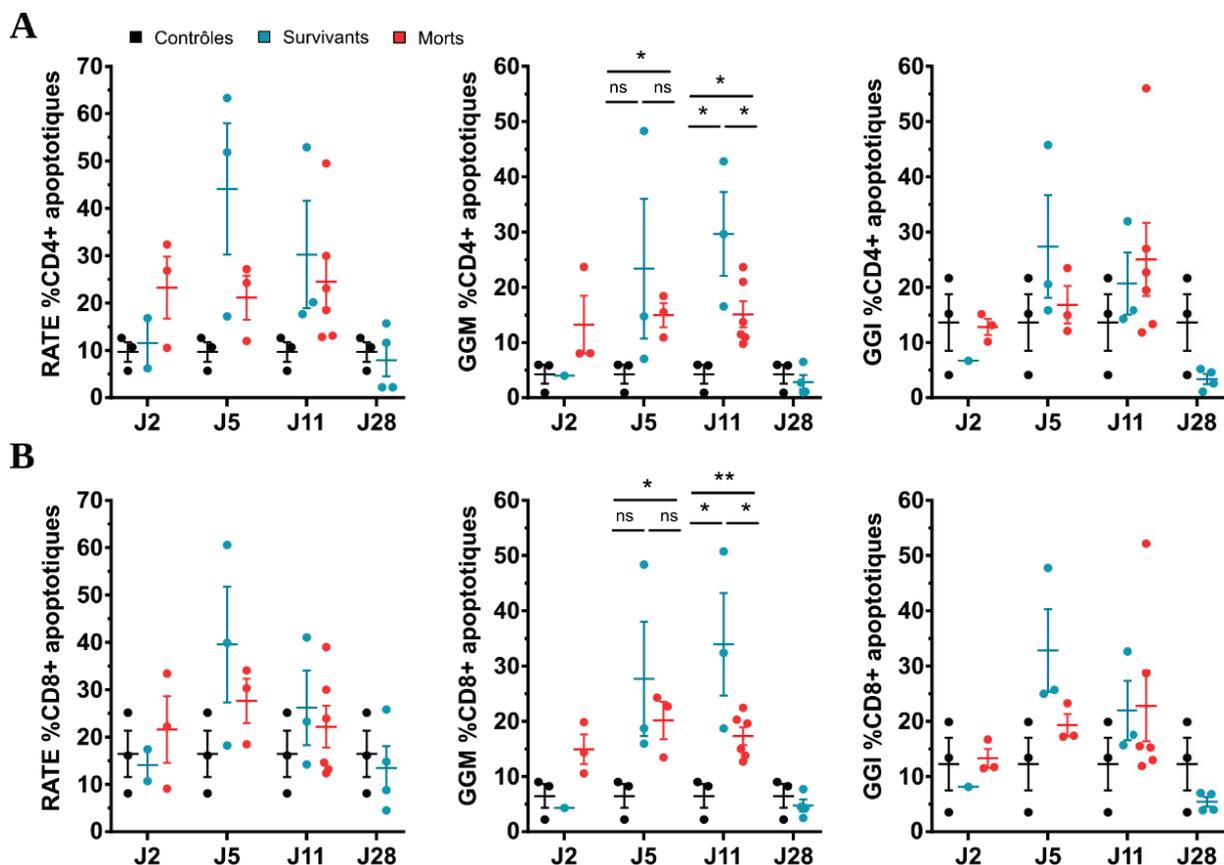


Figure 54 : Apoptose des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions mésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J2, J5, J11 et J28 post infection). L'apoptose des lymphocytes T-CD4+ (CD4+ annexine V+ et 7AAD+/-) (A) et T-CD8+ (CD8+ annexine V+ et 7AAD+/-) (B) a été analysée par cytométrie en flux dans la rate, les GGM et les GGI. Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=3 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J2, J5, J11 et J28 : n = 3, 3, 3 et 4 respectivement ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J2, J5 et J11 : n = 3, 3 et 6 respectivement. Les tests statistiques présentés correspondent à un test de Student entre les groupes indiqués (ns non significatif ; * p<0.05 ; ** p<0.01).

V.2.d. Activation et maturation des lymphocytes B

Le pourcentage de cellules B activées, exprimant le marqueur de costimulation CD80, a augmenté au pic de la maladie dans la rate et les ganglions des animaux morts de la maladie. Cette population de cellules B n'a augmenté que dans les GGI à J5 et à J11 post infection chez les survivants (**Figure 55.A**). Dans les trois organes lymphoïdes testés, nous avons observé une augmentation du pourcentage de cellules B matures exprimant le marqueur CD27 chez les animaux infectés. Cette augmentation est apparue à partir de J5 post infection parmi les deux cohortes mais était toujours présente à J11 post infection uniquement chez les survivants (**Figure 55.B**). **En conclusion, l'infection par LASV entraîne une activation et une maturation des lymphocytes B résidents dans les organes lymphoïdes. Cependant, ces phénomènes ne semblent pas associés à la mort ou à la survie de notre modèle.**

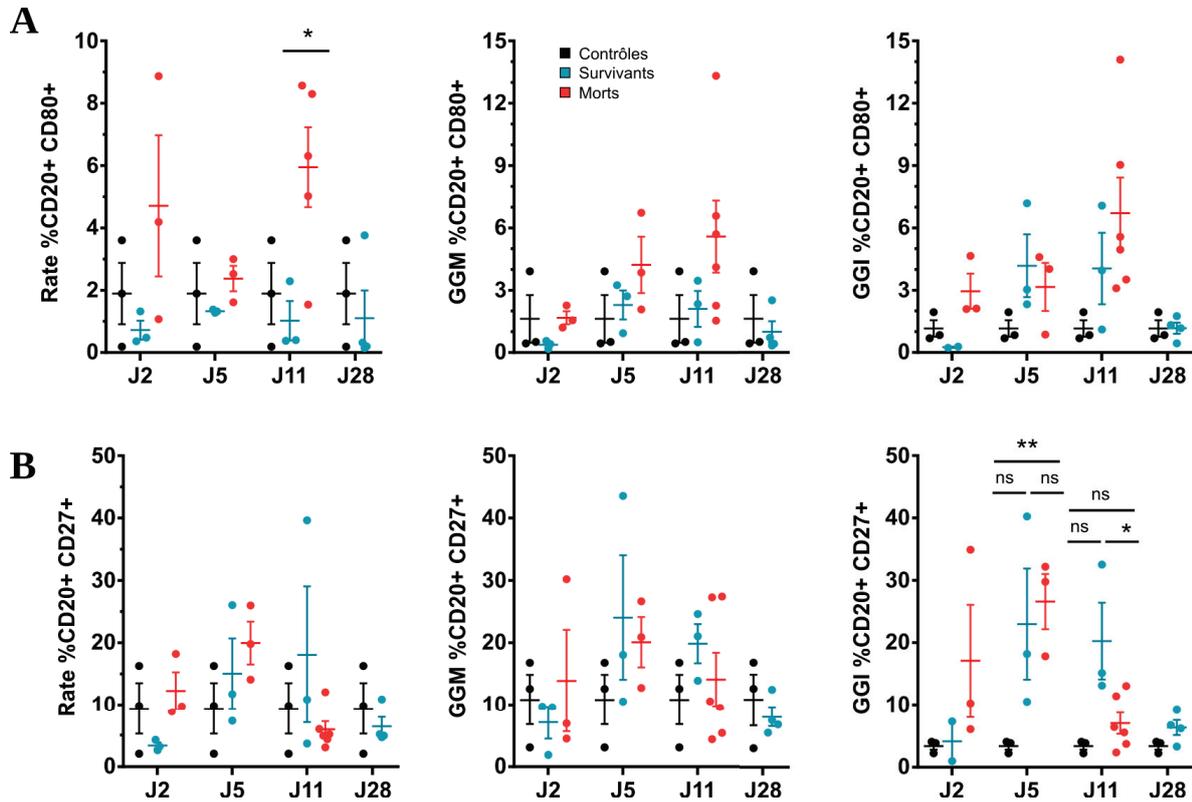


Figure 55 : Activation et maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes au cours de la FL. Les cellules de la rate, des ganglions inguinaux (GGI) et des ganglions mésentériques (GGM) ont été extraites le jour de l'autopsie des animaux (J2, J5, J11 et J28 post infection). L'activation des lymphocytes B (CD20+ CD80+) (A) et leur maturation (CD20+ CD27+) (B) ont été analysées par cytométrie en flux dans la rate, les GGM et les GGI. Nombre d'échantillons des animaux contrôles : n=3 ; nombre d'échantillons des animaux infectés par AV à J2, J5, J11 et J28 : n = 3, 3, 3 et 4 respectivement ; nombre d'échantillons des animaux infectés par Josiah à J2, J5 et J11 : n = 3, 3 et 6 respectivement. Les tests statistiques présentés correspondent à un test de Student entre les groupes indiqués (ns non significatif ; * p<0.05 ; ** p<0.01).

V.3. Etude du profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL

Nous avons analysé l'expression des gènes dans les PBMC afin de caractériser et de comparer les changements d'expression génique au cours de l'issue fatale ou non fatale dans notre modèle. Pour ce faire, nous avons extraits et séquencés les ARN issus des PBMC venant de 3 animaux infectés par LASV-AV (issue non fatale) et 3 animaux infectés par LASV-Josiah (issue fatale), et ce à J2, J4 et J10 post infection. Les animaux sélectionnés correspondent à ceux qui ont été suivis tout au long de la maladie afin de garder les mêmes individus pour chaque point de temps et limiter ainsi les biais d'analyses liés aux différences interindividuelles. Les 3 animaux survivants sélectionnés correspondent à ceux présentant les symptômes les plus légers et les 3 animaux morts de la maladie correspondent à ceux présentant les symptômes les plus marqués. Ce choix a été effectué afin de pouvoir discriminer au mieux les profils d'expression de gènes entre les cas peu sévères et, au contraire, très sévères de la maladie. Le profil des 3 animaux contrôles non infectés a également servi à la normalisation des profils des animaux infectés. Après l'analyse du séquençage des ARNm, nous avons sélectionné les 100 gènes dont la régulation d'expression était la plus importante et la plus statistiquement significative (**Figure 56**). Le séquençage a été réalisé par ViroScan 3D (Lyon) et l'analyse bioinformatique et biostatistique par le HUB de l'Institut Pasteur (Paris). L'interprétation des résultats a ensuite été réalisée par nos soins. Le détail de l'analyse bioinformatique et biostatistique est précisé dans la partie Matériel & Méthodes. Les résultats montrent que le profil d'expression des gènes est homogène entre les individus d'un même groupe. Seul l'animal SUR#2 possède un profil variant légèrement par rapport aux deux autres individus de son groupe. Nous avons identifié des clusters d'expression de gènes distincts entre les groupes d'animaux infectés à J2, J5 et J11 post infection. Nous avons également observé des clusters de gènes distincts entre l'issue fatale et l'issue non fatale à J10 post infection (colonnes 16-17-18 vs 19-20-21), et dans une moindre mesure à J4 post infection (colonnes 10-11-12 vs 13-14-15).

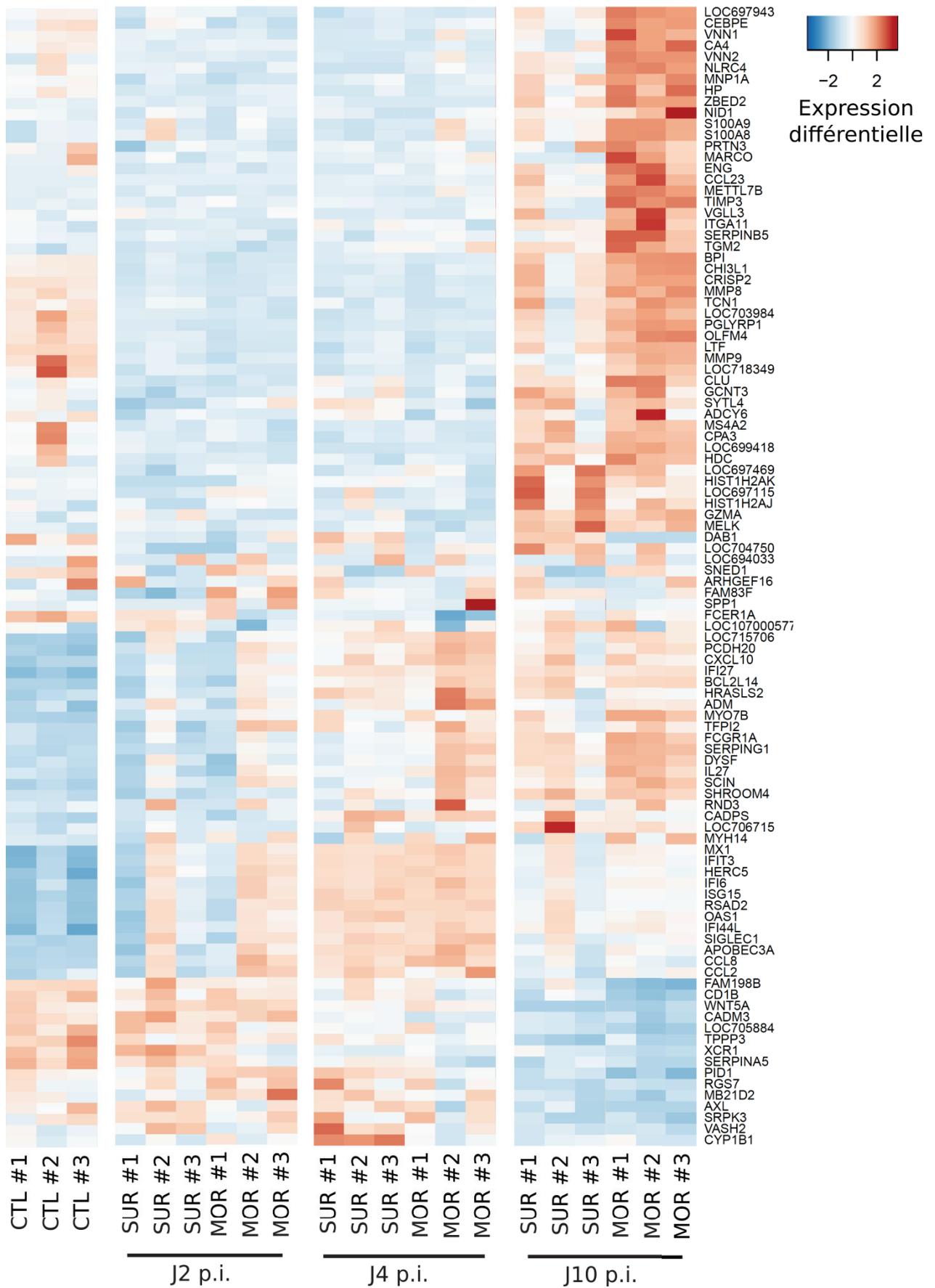


Figure 56 : Profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL (données individuelles). Les ARN issus des PBMC de 3 animaux infectés par LASV AV et 3 animaux infectés par LASV Josiah ont été extraits à J2, J4 et J10 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux contrôles ont été extraits à J28 post infection. Les ARN polyadénylés ont ensuite été séquencés et le profil des 100 gènes les plus différentiellement exprimés et les plus significatifs ont été sélectionnés. Un z score a ensuite été établi pour chaque gène. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression du gène concerné. Les gènes listés ont été sélectionnés avec une *p-value* : $p < 0.0001$.

Les valeurs de la heatmap ont ensuite été réorganisées par moyenne au cours de la cinétique parmi les issues fatales et les issues non fatales (**Figure 57**). Nous nous sommes d'abord intéressés à la cinétique d'expression des gènes au cours des formes non sévères de la maladie (colonnes 2-3-4). Nous avons observé dès J2 post infection une légère surexpression, par rapport aux animaux contrôles, des gènes MX1, IFIT3, HERC5, RSAD2, ISG15, SIGLEC1, IFI6, IFI44L, OAS1, IFI27, tous étant des gènes de réponse à l'IFN-I ou II jouant un rôle dans l'immunité innée antivirale. Au contraire, nous avons observé une régulation négative de certains gènes impliqués dans la réponse des neutrophiles (BPI, PRTN3, MNP1A) et dans leur migration (MMP8 et MMP9) ainsi que des gènes impliqués dans la réponse contre les pathogènes (CLU, HP, MARCO, PGLYRP1). Entre J2 et J4 post infection, nous avons observé une surexpression modérée des gènes synthétisés en réponse à l'IFN-I ou II et impliqués dans la réponse antivirale (cités ci-dessus) ainsi que des chimiokines inflammatoires impliquées dans l'attraction des monocytes (CCL8, CCL2, CXCL10). Nous avons noté également une forte surexpression de CYP1B1, impliqué dans le métabolisme des lipides et VASH2, jouant un rôle dans l'inhibition de l'angiogénèse. Au contraire, certains clusters de gènes ont été régulés négativement, parmi lesquels ont figuré SERPINA5, impliqué dans la cascade de coagulation, et XCR1, un récepteur de chimiokines. Enfin, nous avons observé au cours de l'issue non fatale à J10 post infection un retour à la normal de l'expression des gènes identifiés précédemment et impliqués dans la réponse à l'IFN ainsi que les gènes codant les chimiokines CCL8, CCL2, CXCL10. Nous avons également un maintien de la régulation négative des gènes XCR1 et SERPINA5. De manière intéressante le gène codant pour AXL, un récepteur auxiliaire du LASV, a été sous exprimé à J10 post infection alors qu'il était surexprimé à J2 et à J4 post infection. Les gènes VASH2 et CYP1B, surexprimés à J5 post infection, étaient sous exprimés au pic de la maladie. Au contraire, nous avons observé une régulation positive des gènes codant pour l'IL-27, une cytokine pro et anti-inflammatoire, ainsi que SERPING1, dont la protéine est impliquée dans la régulation de l'activation de la cascade du complément. DYSFR1, également surexprimé, est impliqué dans la réparation du muscle squelettique. Nous avons également observé une surexpression des gènes impliqués dans la réponse des neutrophiles (BPI, PRTN3, MNP1A). Une forte surexpression des gènes MELK, GCNT3 et

SYLT4, ayant des fonctions cellulaires variées, ainsi que le gène GZMA, codant le granzyme A, une protéine cytolytique produit par les cellules immunitaires cytotoxiques, a également été identifié uniquement à J10 post infection.

Au cours de l'issue fatale à J2 post infection, colonnes 5-6-7, nous avons observé un profil similaire à celui observé au cours de l'issue non fatale. Les gènes synthétisés en réponse à l'IFN (MX1, IFIT3, HERC5, RSAD2, ISG15, SIGLEC1, IFI6, IFI44L, OAS1, IFI27) ont également été surexprimés chez les animaux morts de la maladie. L'oncogène FAM83F et le gène SPP1, codant pour une protéine exprimée par les cellules immunitaires et jouant un rôle dans l'inflammation, ont été fortement surexprimés dès ce stade précoce de l'infection fatale. A l'instar de l'issue non fatale à J2 post infection, nous avons observé chez les animaux morts de la maladie une régulation négative des gènes impliqués dans la réponse des neutrophiles et dans leur migration (BPI, PRTN3, MNP1A, MMP8, MMP9) ainsi que des gènes impliqués dans la réponse contre les pathogènes (CLU, HP, MARCO, PGLYRP1). Entre J2 et J4 post infection, il a été identifié une surexpression d'un nombre important de gènes. Parmi ceux-ci ont été distingués des gènes activés en réponse à l'IFN-I ou II et des gènes codant pour des chimiokines (déjà citées ci-dessus). Le gène ADM, dont l'expression est impliquée dans la vasodilatation, a également été surexprimé dans les PBMC de ces animaux. Nous avons observé une surexpression maintenue du gène SPP1 ainsi que la surexpression des gènes IL27, SERPING1, SHROOM4, SCIN, MYH14 et RND3 qui étaient sous exprimés à J2 post infection. Ces derniers étaient également surexprimés à J10 post infection. Au cours du pic de la maladie, nous avons observé un retour à la normale de l'expression des gènes synthétisés en réponse à l'IFN, aux gènes codant les chimiokines, AXL et SPP1. Au contraire, de nombreux gènes ont été surexprimés, notamment des gènes impliqués dans la réponse des neutrophiles (BPI, PRTN3, MNP1A, MMP8 et MMP9), dans la réponse contre les pathogènes (CLU, HP, MARCO, PGLYRP1, S100A9, S100A8), dans l'inflammation (NLRC4, CCL23) et dans l'activité cytotoxique des lymphocytes (GZMA). A l'instar de l'issue non fatale, les gènes MELK, SYL4 et GCNT3 ont également été surexprimés au cours de l'issue fatale, et ce, spécifiquement à J10 post infection.

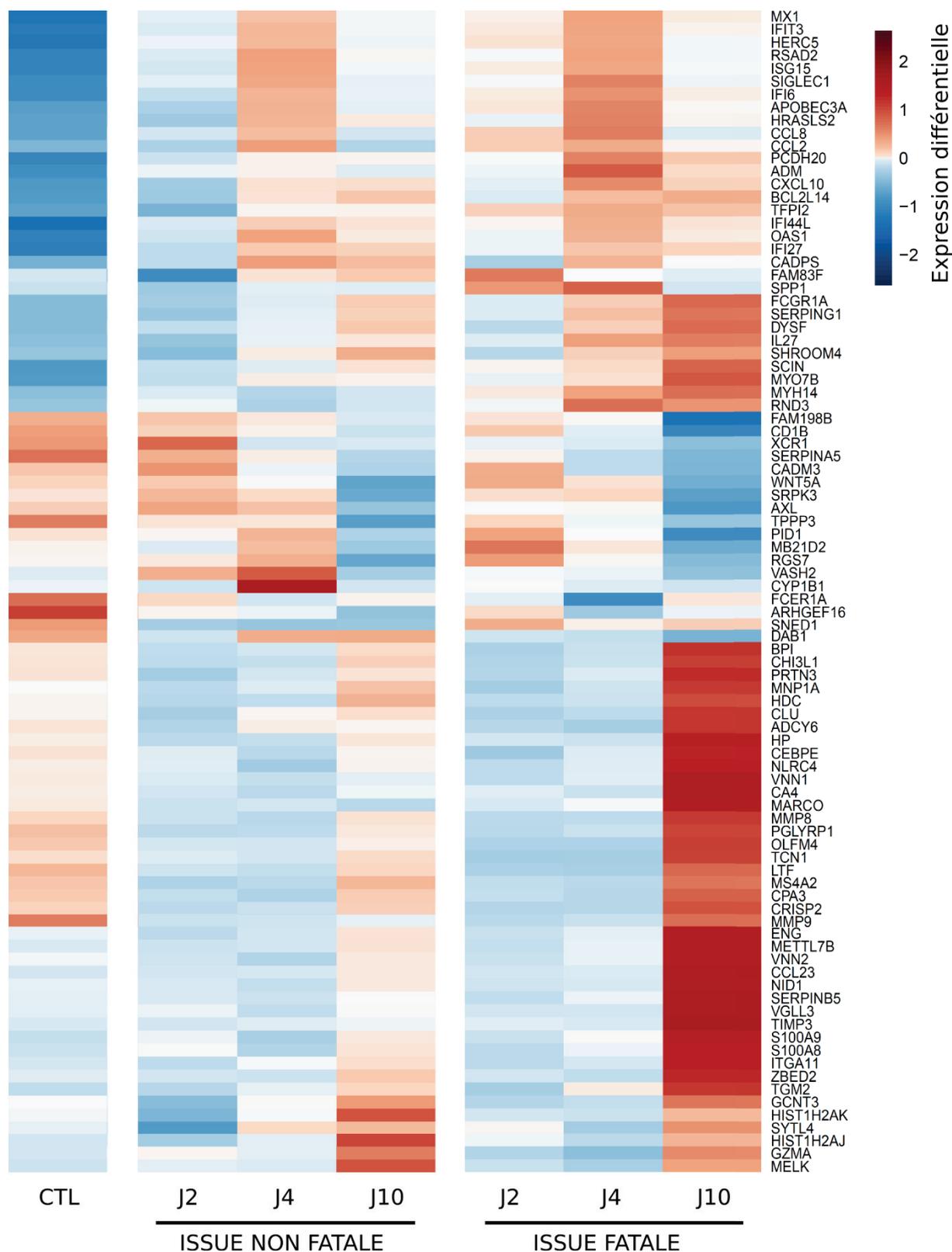


Figure 57 : Profil transcriptomique des PBMC au cours de la FL (données regroupées).
 Les ARN issus des PBMC de 3 animaux infectés par LASV AV et 3 animaux infectés par LASV Josiah ont été extraits à J2, J4 et J10 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux contrôles ont été extraits à J28 post infection. Les ARN polyadénylés ont ensuite été séquencés et le profil des 100 gènes les plus différentiellement exprimés et les plus significatifs ont été sélectionnés. Les données présentées correspondent à la moyenne par groupe et par point de cinétique. Un z score a ensuite été établi pour chaque gène. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression du gène concerné. Les gènes listés ont été sélectionnés avec une *p-value* : $p < 0.0001$.

Nous avons ensuite réorganisé les valeurs obtenues au cours du séquençage afin de pouvoir comparer le profil transcriptomique des PBMC entre les issues fatales et non fatales à J2 (**Figure 58**), J4 (**Figure 59**) et J10 post infection (**Figure 60**). L'analyse des gènes différentiellement exprimés ayant déjà été faite auparavant, nous nous sommes focalisés ici uniquement sur les gènes différentiellement exprimés dans les PBMC entre l'issue fatale et non fatale de la maladie. Nous avons observé à J2 post infection (**Figure 58**) une sous expression des gènes codant pour deux Serpines (SERPINA5, SERPINB5) et l'inflammasome (NLRC4), impliquées dans l'inflammation, plus marquée au cours de l'issue fatale par rapport à l'issue non fatale. 10 gènes ont été spécifiquement surexprimés chez les animaux survivants dès J2 post infection mais pas au cours de l'issue fatale. Parmi eux, 4 gènes étaient impliqués dans la réponse immunitaire ou dans la réponse inflammatoire (S100A8, S100A9, XCR1, GZMA), un gène dans l'angiogénèse (VASH2), ainsi que AXL, le récepteur auxiliaire du LASV. Comme nous l'avons vu précédemment, pas moins de 9 gènes impliqués dans l'immunité innée ont été surexprimés au cours des deux issues, notamment IFI44L, OAS1, HERC5, MX1, RSAD2, SIGLEC1, ISG15, IFIT3, IFI27. Cette surexpression était néanmoins plus importante au cours de l'issue fatale. La forme sévère de la maladie a également été caractérisée par la surexpression spécifique de 26 gènes, notamment des gènes codant des médiateurs de l'inflammation (CXCL10, CCL8, CCL2, IL27, SERPING1), de gènes de réponse à l'IFN (IFI6), de gènes impliqués dans l'immunité (APOBEC3A, FCGR1A) et des gènes pro apoptotiques (BCL2L14).

Nous avons observé à J4 post infection une surexpression spécifique de gènes impliqués dans l'inflammation (S100A8, S100A9, CCL23, IL27, CXCL10, SERPING1) ainsi que dans l'angiogénèse/vasodilatation (ADM) et qui n'a pas été observée pendant l'issue non fatale (**Figure 59**). Au cours de cette dernière, nous avons observé une surexpression spécifique du gène AXL, déjà surexprimé à J2 post infection, ainsi que des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (CLU, GZMA), dans le métabolisme des lipides (CYP11B1) et dans le trafic intracellulaire (SYTL4).

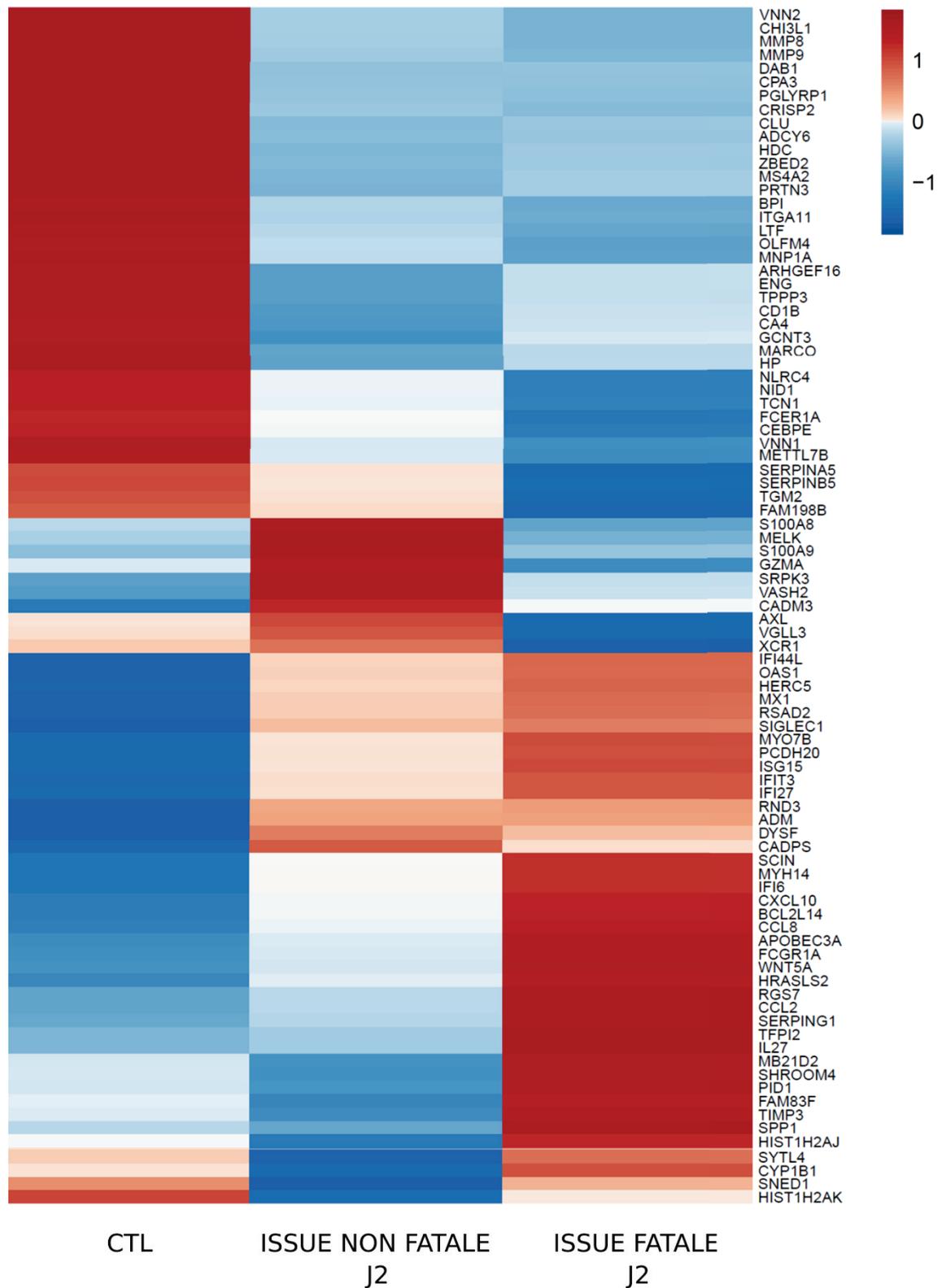


Figure 58 : Profil transcriptomique des PBMC J2 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux infectés par LASV AV et 3 animaux infectés par LASV Josiah ont été extraits à J2 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux contrôles ont été extraits à J28 post infection. Les ARN polyadénylés ont ensuite été séquencés et le profil des 100 gènes les plus différenciellement exprimés et les plus significatifs ont été sélectionnés. Les données présentées correspondent à la moyenne par groupe et par point de cinétique. Un z score a ensuite été établi pour chaque gène. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression du gène concerné. Les gènes listés ont été sélectionnés avec une *p-value* : $p < 0.0001$.

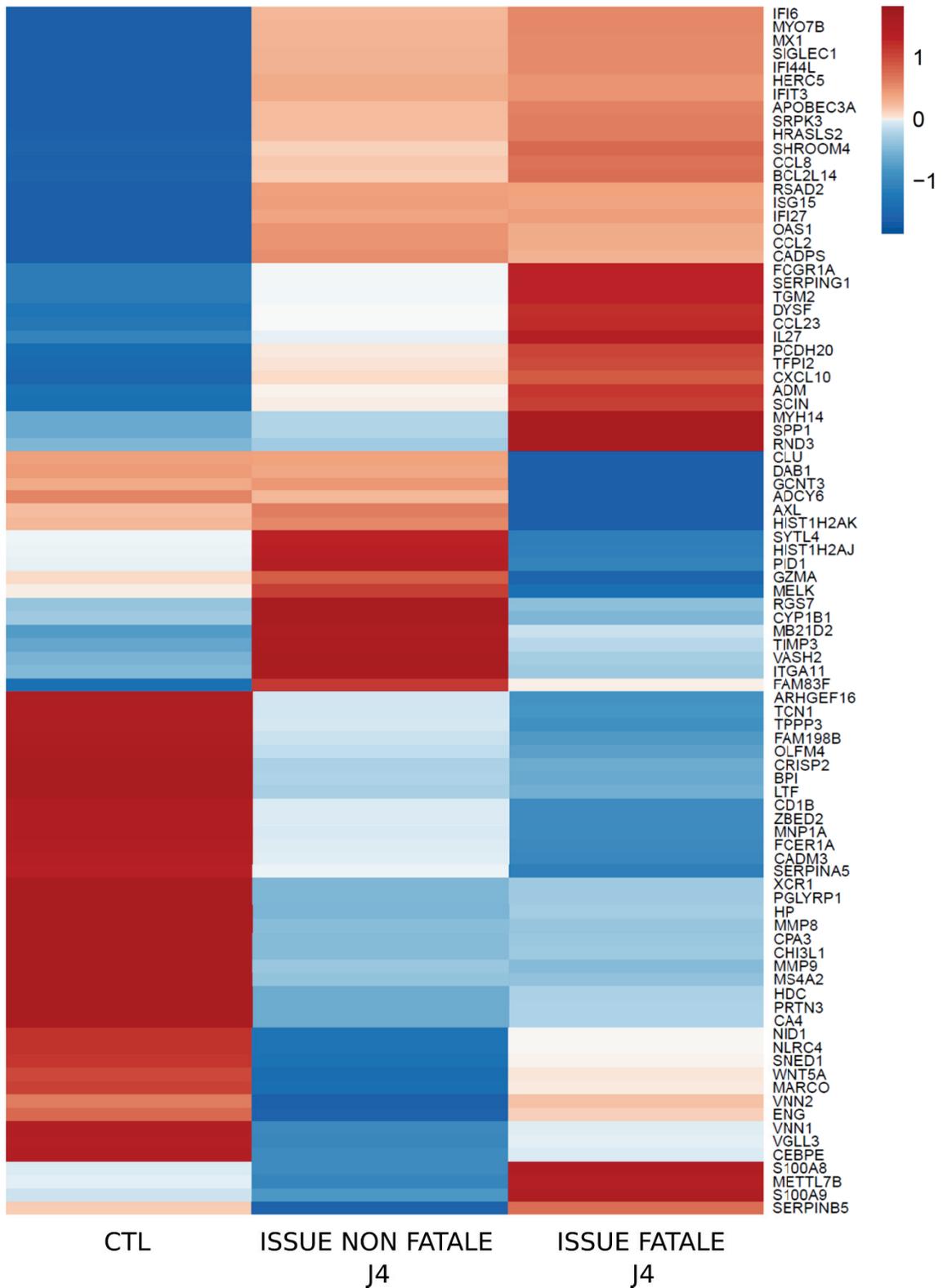


Figure 59 : Profil transcriptomique des PBMC J4 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux infectés par LASV AV et 3 animaux infectés par LASV Josiah ont été extraits à J4 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux contrôles ont été extraits à J28 post infection. Les ARN polyadénylés ont ensuite été séquencés et le profil des 100 gènes les plus différenciellement exprimés et les plus significatifs ont été sélectionnés. Les données présentées correspondent à la moyenne par groupe et par point de cinétique. Un z score a ensuite été établi pour chaque gène. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression du gène concerné. Les gènes listés ont été sélectionnés avec une *p-value* : $p < 0.0001$.

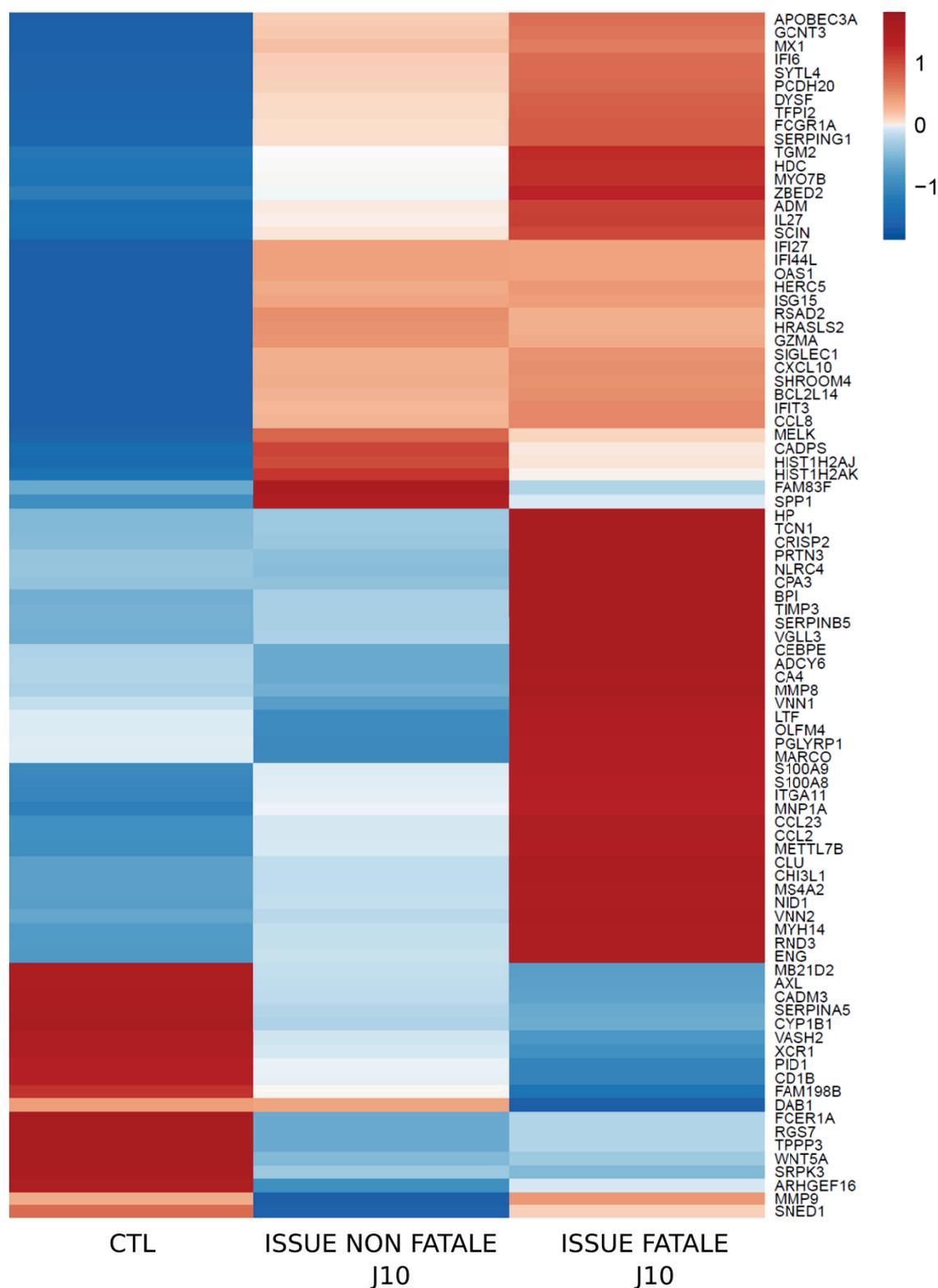


Figure 60 : Profil transcriptomique des PBMC J10 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux infectés par LASV AV et 3 animaux infectés par LASV Josiah ont été extraits à J10 post infection. Les ARN issus des PBMC de 3 animaux contrôles ont été extraits à J28 post infection. Les ARN polyadénylés ont ensuite été séquencés et le profil des 100 gènes les plus différenciellement exprimés et les plus significatifs ont été sélectionnés. Les données présentées correspondent à la moyenne par groupe et par point de cinétique. Un z score a ensuite été établi pour chaque gène. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression du gène concerné. Les gènes listés ont été sélectionnés avec une *p-value* : $p < 0.0001$.

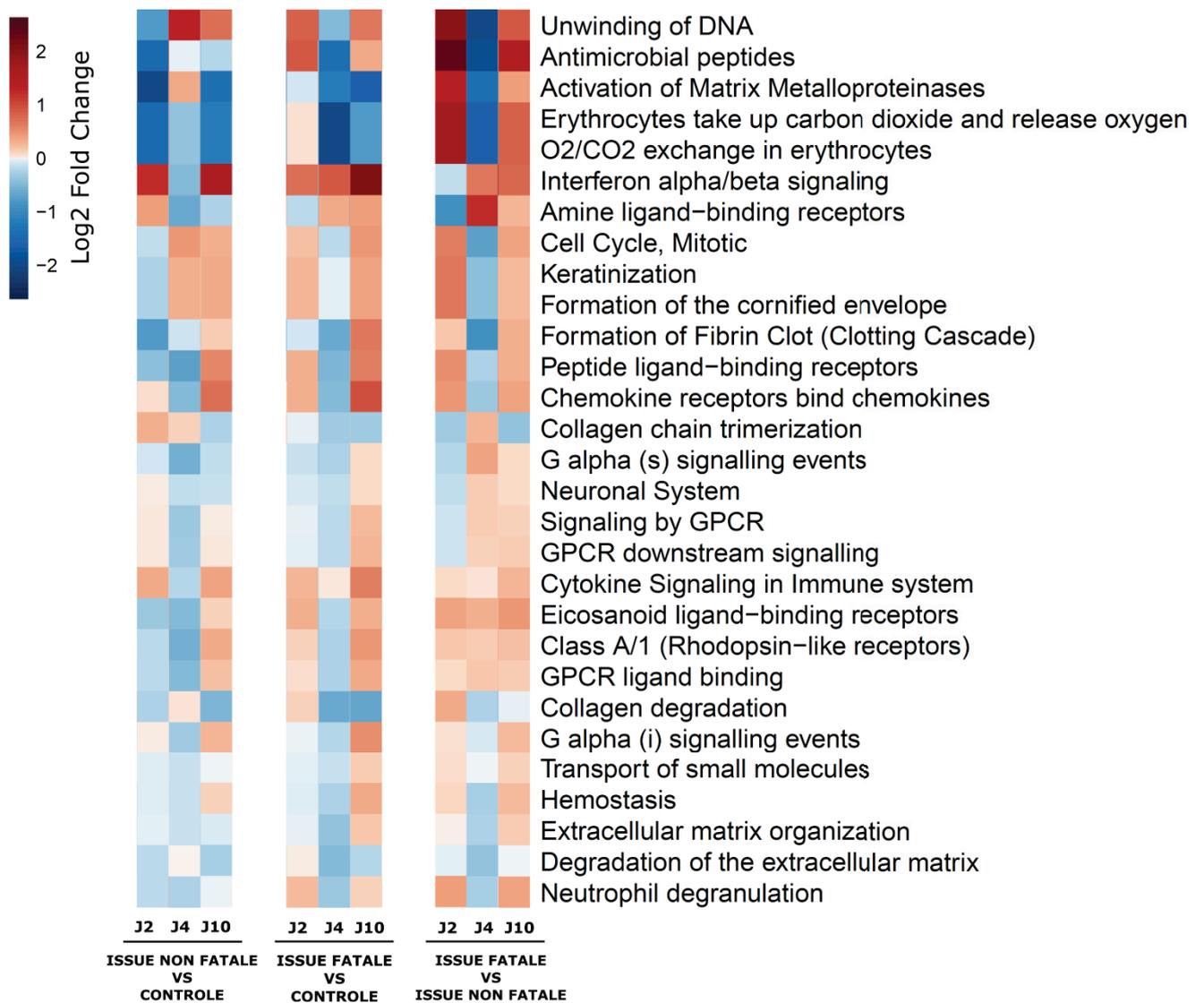


Figure 61 : Régulation des voies de signalisations au cours de la FL. Une analyse *in silico* des voies de signalisation différemment exprimées a été établie à partir des 100 gènes identifiés précédemment. Les voies les plus différemment exprimées et les plus statistiquement significatives ont ensuite été sélectionnées. Les données présentées correspondent à la moyenne par groupe et par point de cinétique pour chaque voie de signalisation présentée. L'intensité de bleu correspond à une sous-expression et les intensités de rouge correspondent à une surexpression générale de la voie de signalisation concernée.

Enfin, les différences observées entre les deux issues de la maladie à J10 post infection ont concerné les gènes codant pour les chimiokines/cytokines, pour la vasodilatation/angiogénèse et pour les gènes de réponse à l'IFN-I, surexprimés de manière plus importante au cours de l'issue fatale (**Figure 60**). Parmi notre liste, 34 gènes étaient surexprimés uniquement au cours de l'issue fatale, notamment des gènes synthétisés en réponse à un pathogène (HP, BPI, PGLYRP1, MARCO, S100A9, S100A8, MNP1A, CLU), dans la réponse des neutrophiles (TCN1, PRTN3, LTF), dans l'inflammation (CCL23, CCL2, NLRC4, SERPINB5), dans l'hémostase (TIMP3, MMP8, MMP9, ENG), dans le métabolisme protéique (VNN1, VNN2),

dans la réponse immunitaire générale (OLFM4, CHI3L1) et enfin un gène impliqué dans des neuropathies, et notamment dans la surdité (MYH14).

Pour terminer la caractérisation du transcriptome des PBMC, nous nous sommes demandé quelles voies de signalisation étaient régulées au cours de l'infection et si des différences étaient observables entre les morts et les survivants de la FL. Une analyse bio-informatique a été effectuée afin de regrouper les gènes différentiellement exprimés dans les voies de signalisation cellulaires dans les PBMC (**Figure 61**). L'analyse a montré une régulation négative des voies cellulaires impliquées dans la synthèse de peptides antimicrobiens au cours du temps chez les animaux survivants (colonnes 1-2-3). Nous avons également identifié une forte surexpression de la voie de signalisation liée à l'IFN-I ainsi que des voies de signalisation des chimiokines et des cytokines chez ce même groupe d'animaux. Une légère activation de la voie impliquée dans la cascade de coagulation a également été identifiée au cours du temps. De manière similaire à l'issue non fatale, une surexpression de la voie de signalisation de l'IFN-I, des chimiokines, des cytokines et de la cascade de coagulation a été observée au cours de l'issue fatale. Cependant, une surexpression progressive de la voie cellulaire impliquée dans l'hémostase et dans le système neuronal n'a été observée que chez les animaux moribonds.

La comparaison du profil d'expression des voies de signalisation au cours des deux issues de la maladie a montré que la voie liée à l'IFN-I était sous exprimée chez les animaux moribonds par rapport aux survivants à J2 post infection, indiquant que la réponse IFN-I était plus forte et plus précoce chez les survivants. En revanche, dans les stades terminaux, la réponse IFN-I a été davantage surexprimée chez les animaux morts de la maladie par rapport aux survivants. La voie de signalisation des chimiokines et cytokines est également surexprimée chez les animaux moribonds par rapport aux survivants. Les mêmes observations ont été faites concernant les voies de la coagulation, de l'hémostase et des metalloprotéinases, toutes étant impliquées dans la physiologie de l'hémostase. Enfin, les voies de signalisations du système neuronal sont surexprimées au cours des issues fatales par rapport aux issues non fatales.

Ainsi, au cours de la FL, nous avons observé dans les PBMC une surexpression des voies de signalisation impliquées dans l'immunité innée et l'inflammation (ISGs, signalisation des cytokines et des chimiokines, dégranulation des neutrophiles) ainsi que dans l'hémostase et la cascade de coagulation. Ces voies de signalisation sont, en générale, davantage surexprimées au cours de l'issue fatale.

Discussion

Malgré l'importante morbidité et le fort taux de mortalité causés par la fièvre de Lassa, la pathogenèse et les réponses immunes induites pendant la maladie restent encore inconnues. Depuis 2001, notre laboratoire s'intéresse à ces paramètres en utilisant des modèles *in vitro* humains [145,146,243,255,261]. L'originalité de ces approches réside dans la comparaison entre les infections par LASV, un virus hautement pathogène et MOPV, son homologue non pathogène, afin d'identifier les facteurs viraux impliqués dans la pathogénicité et l'immunogénicité. Il a ainsi été montré que les DC et les macrophages étaient des cibles précoces des virus LASV et MOPV. Ces cellules sont capables de répliquer les deux virus mais contrairement à MOPV, l'infection par LASV ne parvient pas à activer les CPA, aboutissant à l'absence de synthèse d'IFN-I. Cette absence de réponse IFN-I peut être responsable de l'absence de réponse immunitaire adaptative robuste en réponse à l'infection par LASV. En effet, les DC infectées par LASV ne stimulent que faiblement les lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ tandis que les DC infectées par MOPV activent les cellules T de manière précoce, avec une forte prolifération et l'acquisition de phénotypes effecteurs et mémoires [146,243]. Grâce à ces modèles *in vitro*, il a également été démontré que les cellules NK n'avaient pas de rôle direct dans la différence de pathogénicité entre LASV et MOPV [255]. Ces résultats démontrent que les différentes réponses des CPA infectées par LASV ou MOPV résultent en la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative différente, probablement impliquée dans la différence de pathogénicité des deux virus. Ces avancées obtenues *in vitro* ne permettent cependant pas de caractériser la pathogenèse et les réponses immunitaires se déroulant dans un organisme entier et complexe. L'accès aux cas cliniques humains est très limité en raison de la situation politique des pays endémiques, de leurs infrastructures de santé limitées et de la nature dangereuse du LASV ainsi que de la nécessité d'un laboratoire P4 pour sa manipulation. L'utilisation d'un modèle animal pour comprendre la pathogenèse du LASV est donc nécessaire. Parmi les modèles animaux disponibles, seul le PNH est pertinent car il est le seul modèle qui reproduit les mécanismes pathogéniques et les symptômes retrouvés chez l'humain. Il y a environ 10 ans, notre équipe a mis en place au laboratoire un premier modèle, basé sur le singe cynomolgus [204]. Au cours de cette expérimentation pilote, il a été établi une dose avec laquelle deux des trois animaux infectés ont succombé à l'infection, permettant l'identification de mécanismes associés à la mort ou au contraire, au control viral. Le tableau

clinique était similaire à celui observé chez l'Homme au cours de la FL, caractérisé par de la fièvre, une perte de poids, une dépression et un syndrome respiratoire aigu. Tous les animaux ont développé une thrombocytopénie et une lymphopénie transitoire. Les survivants ont montré moins de lésions au niveau histologique ainsi qu'une plus faible charge virale par rapport aux animaux morts de la maladie. Tous les animaux ont développé une forte réponse humorale, quelle que soit l'issue de la maladie, mais une réponse IFN-I a été identifiée de manière précoce chez les survivants tandis que celle-ci était plus tardive chez les animaux moribonds. La cytokine pro-inflammatoire IL-6 a également été détectée uniquement dans le plasma des animaux infectés de manière létale. Il a également été observé chez les survivants au cours de cette étude princeps une activation des monocytes suivie par une augmentation du nombre de monocytes circulant. De manière similaire, nous avons observé une activation des lymphocytes T marquée et précoce chez les survivants tandis que celle-ci était faible et retardée chez les animaux morts de la maladie ^[204,249]. Les résultats de cette étude montrent donc que l'induction d'une forte réponse immunitaire et que le contrôle de la réplication virale est associée avec la survie, tandis que les infections fatales sont caractérisées par des altérations de la formule sanguine ainsi qu'une faible immunité et une réplication virale non contrôlée dans les organes. Les résultats obtenus soulèvent également l'hypothèse que l'issue de la maladie, c'est-à-dire le contrôle de la réplication virale et la survie ou la fièvre hémorragique sévère suivie de la mort, est déterminée de manière précoce après l'infection, probablement avant la survenue des symptômes. Dans le cadre de cette thèse, nous avons amélioré le modèle animal existant de FL chez le singe cynomolgus en utilisant deux souches virales du LASV, AV et Josiah, ainsi qu'un nombre plus important d'animaux. Ce modèle nous a permis d'investiguer les signes cliniques, les altérations biochimiques et hématologiques, la dynamique virale, la physiopathogenèse, les réponses immunitaires et le profil transcriptomique des animaux au cours des différentes phases de la FL. Ces phases vont des périodes très précoces après l'infection (J2 post infection), aux phases d'incubation (J5 post infection), jusqu'au pic de la phase aiguë de la maladie (J11 post infection), et enfin jusqu'à la disparition des symptômes et au retour du tonus physique (J28 post infection). De plus, l'utilisation de la souche très pathogène (Josiah) et moins pathogène (AV) du LASV nous ont permis une comparaison de chaque paramètre pathogénique entre les deux issues de la maladie : la survie et la mort.

I. Notre modèle de FL chez le singe cynomolgus

De nombreuses études se sont basées sur le singe cynomolgus ou le singe rhésus pour étudier la FL [68,181,199,203–205,207–209,211,212,280]. La grande majorité de ces études se sont principalement focalisées sur l'évaluation de candidats vaccins ou de traitements thérapeutiques tandis que seulement quelques-unes ont étudié la pathogenèse. De plus, les investigations précédentes ont examiné les tissus des animaux infectés au moment de l'euthanasie lorsque ces derniers étaient moribonds, permettant d'approfondir nos connaissances de la pathogenèse aux temps précédant la mort, mais laissant les étapes plus précoces inexplorées. Notre modèle, comprenant des euthanasies au point limite mais également des euthanasies programmées à J2, J5 et J11 post infection, permet ainsi une étude approfondie de la pathogenèse de la FL dans le sang et les tissus à différentes phases de la maladie. Nous avons utilisé deux différentes souches du virus LASV nous permettant l'analyse comparée des mécanismes pathogéniques se produisant au cours des formes sévères et non sévères de FL. Nous avons injecté 1000 PFU de la souche AV ou de la souche Josiah par voie sous cutanée. Plusieurs voies d'inoculation ont été testées chez le PNH, notamment la voie sous cutanée, intrapéritonéale, intramusculaire et plus récemment par aérosols [181,205,211]. L'infection par aérosols n'étant pas possible dans le laboratoire P4, nous avons choisi la voie sous cutanée, proche du mode de transmission cutanéomuqueux observé chez l'Homme [267]. Nous avons utilisé la souche AV car celle-ci avait permis l'obtention d'une mortalité approchant 50% chez les singes cynomolgus au cours de l'étude pilote réalisée dans notre laboratoire (avec 2 singes euthanasiés au point limite sur un total de 3 animaux) [204]. Cependant, tous les singes infectés par cette souche virale au cours de l'étude actuelle ont survécu. Cette différence de pathogénicité pourrait s'expliquer par l'origine des animaux. En effet, les singes provenaient d'un fournisseur différent entre les deux études. De plus, les singes de l'étude pilote étaient des animaux capturés dans leur milieu naturel tandis que ceux utilisés au cours de cette étude étaient des animaux d'élevage provenant de l'île Maurice. Il a été montré que les cynomolgus Mauriciens et les cynomolgus d'Asie du sud-est possédaient d'importantes divergences génétiques. De plus, les cynomolgus Mauriciens seraient ceux possédant la moindre diversité génétique parmi toutes les populations de cynomolgus [307]. Cette diversité génétique est, par exemple, responsable de la différence de pharmacocinétique du Favipiravir entre des cynomolgus Chinois et des cynomolgus Mauriciens [308]. Il est ainsi possible qu'un fond génétique différent soit responsable de la différence de mortalité observée entre ce projet et l'étude pilote. Afin d'obtenir une issue fatale

dans notre modèle, nous avons donc également utilisé la souche Josiah, ayant montré une forte pathogénicité chez le primate, avec la même dose et la même voie d'inoculation que la souche AV sur une autre cohorte d'animaux. Tous les animaux infectés par LASV Josiah et suivis le long de la maladie ont été euthanasiés entre J11 et J15 post infection après avoir atteint le point limite de souffrance, défini par le comité d'éthique. Bien qu'appartenant à deux clades différents, la souche Josiah, originaire de Sierra Leone, et la souche AV, isolée à partir d'un cas clinique ayant voyagé au Ghana, Burkina Faso et Côte d'Ivoire, sont les plus phylogénétiquement proches, avec 82% d'homologies dans leur séquence nucléotidique et 94% dans leur séquence en acides aminés ^[46]. Cette particularité justifie leur utilisation pour obtenir des formes sévères et des formes non sévères de FL. Nous avons ensuite infecté de nouvelles cohortes composées de 3 animaux avec l'une ou l'autre des deux souches avant de procéder à l'euthanasie séquentielle à J2, J5 et J11 post infection, assurant ainsi l'accès aux tissus à différentes phases de la maladie et au cours des différentes issues. Ce modèle et ce protocole permet donc l'étude de la pathogénèse de la FL au fur et à mesure du temps dans le sang et les organes des animaux, ce qui n'a jamais été réalisé auparavant, à une exception près ^[181]. Bien que 100% des animaux infectés par LASV-AV aient survécu et 100% des animaux infectés par LASV-Josiah aient succombé, le nombre d'animaux est trop faible pour prédire avec certitude les issues rencontrées par les animaux infectés par AV ou Josiah et euthanasiés à J2 ou à J5 post infection. Par conséquent, il faudra identifier des marqueurs précoces d'infection, identifiés chez les animaux suivis tout au long de la maladie, qui seraient spécifiques de l'issue de la maladie et qui seraient retrouvés chez les animaux infectés puis euthanasiés à J5 ou à J11 post infection. Les gènes identifiés au cours du transcriptome pourraient permettre une prédiction robuste de l'issue développée par les animaux dès J2 et J5 post infection, notamment via l'identification de clusters de gènes surexprimés spécifiquement au cours de l'une ou l'autre des issues. Les gènes GZMA, MELK, VASH2 et AXL ont, par exemple, été surexprimés uniquement au cours de l'issue non létale. Au contraire, les gènes MYH14, TFPI2, SPP1 et SNED1 ont été surexprimés uniquement au cours de l'issue létale (voir la section V de la discussion pour plus de précisions). L'analyse du transcriptome chez les animaux euthanasiés à J2 ou J5 post infection n'a malheureusement pas encore été établie.

Les observations cliniques réalisées dans notre modèle sont similaires avec celles précédemment décrites chez les primates infectés par LASV ^[199,203,208,294]. Elles incluent fièvre, anorexie, perte de poids, dépression, ainsi que des saignements et une hypothermie au cours des phases terminales. Nos animaux n'ont cependant pas développé de signes neurologiques évi-

dents, contrairement à d'autres études, y compris notre expérimentation pilote ^[181,204,205]. Les symptômes observés étaient cependant plus marqués chez les animaux morts de la maladie par rapport aux animaux survivants et de la fièvre a été mesurée uniquement chez les animaux développant une forme létale de la maladie. Nous n'excluons pas le fait que les animaux infectés par AV aient pu développer de la fièvre, car les prises de températures rectales ont été faites après anesthésie, c'est-à-dire à une période où les animaux sont en hypothermie. Les températures enregistrées ne sont donc pas optimales et sont à considérer avec précaution. Les observations cliniques montrent cependant une grande variété dans l'intensité des symptômes entre les animaux infectés par AV et les animaux infectés par Josiah, allant de l'infection quasi asymptomatique à la mort des animaux, en passant par des sévérités intermédiaires. En conclusion, notre modèle a reproduit les différentes sévérités observées au cours des FL humaines ainsi que les deux issues possibles : la survie ou la mort.

II. Les données cliniques

Les FHV sont caractérisées par des altérations majeures de la formule sanguine, de la coagulation et des fonctions rénales et hépatiques. Bien que ces dommages ne soient pas assez sévères au cours de la FL pour être la cause du choc terminal, ils agissent de concert et participent à l'évolution de la maladie vers une issue fatale. Cependant, la cinétique de ces altérations au cours de l'infection n'est pas connue. Grâce à notre modèle, nous avons acquis de multiples paramètres biologiques au cours de la FL donnant des résultats intéressants qui peuvent être corrélés aux symptômes et aux changements physiopathologiques. De plus, de nombreuses différences ont été observées entre les issues fatales et non fatales, pouvant constituer des marqueurs prédictifs de la gravité de la maladie. La concentration en protéine C réactive (CRP) a augmenté dans le plasma des animaux infectés, indiquant l'occurrence d'une réaction inflammatoire au cours de la FL. Cette réponse inflammatoire a été spécifique de l'infection virale puisque sa détection et sa persistance dans le plasma se sont produites simultanément à la circulation de particules virales infectieuses dans le plasma de ces mêmes animaux. Les changements affectant la fonction rénale ont été identifiés uniquement au cours des maladies sévères menant à la mort des animaux, comme le montrent les forts taux de créatinine et d'urée sanguine. La défaillance rénale est donc associée à l'issue fatale de la FL. Cette observation est confirmée par une étude clinique menée chez une cohorte de 291 patients au Nigéria, où la hausse de la créatinine et de l'urée sanguine a été corrélée avec un pronostic défavorable ^[174]. Les mêmes facteurs ont été associés à l'issue fatale chez des patients au cours de l'épidémie de maladie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest ^[309]. De plus, ces facteurs de défaillance rénale sont apparus de manière concomitante avec l'inflammation modérée et le fort titre viral observés uniquement dans le rein chez les animaux moribonds à J11 post infection. En accord avec de précédentes études chez le PNH ^[208,209,213] et l'Homme ^[170,174,228,229], nous avons confirmé qu'une hausse de la cytolysé hépatique se produit au cours de la FL, et en particulier au cours de l'issue fatale, comme cela a été montré avec la hausse des taux de transaminases hépatiques aspartate transaminase (AST) et alanine transaminase (ALT). Cette hausse étant plus importante au cours de l'issue fatale comparée aux survivants, des taux élevés des AST et ALT sont associés à une issue fatale et sont indicatifs, en partie, d'une défaillance hépatique. Cette hausse des transaminases a été associée également à la présence d'un titre viral élevé dans les organes à J11 post infection ainsi qu'à la présence d'une forte inflammation diffuse du parenchyme hépatique, deux événements observés uniquement chez les

animaux morts de la maladie. Les fortes concentrations d'AST/ALT et de créatine phosphokinase (CPK) indiquent également des lésions sur d'autres organes que le foie et que la rhabdomyolyse est un évènement spécifique de l'issue fatale. Une seule étude a monitoré la concentration de CPK, et ce, au cours de deux études cliniques humaines ^[170,179]. Le taux de CPK était élevé chez certains patients atteints de FL mais aucune corrélation avec la sévérité de la maladie n'a pu être faite. L'hypocalcémie, observée également chez les animaux ayant développé une forme sévère de la maladie, est également en accord avec la rhabdomyolyse, qui résulte dans le transfert d'ions Ca^{2+} libres du sang vers les tissus ^[310]. Les mécanismes de la rhabdomyolyse induite par une infection virale ne sont pas connus mais peuvent être impliqués dans la cascade pathogénique qui mène au choc terminal et à la mort de l'individu. En effet, la nécrose des tissus musculaires peut entraîner la fuite et l'accumulation de fluides vasculaires dans un espace interstitiel normalement non perfusé. Ce phénomène, appelé « third spacing » en anglais, mène à une hypovolémie vasculaire. De plus, les dommages musculaires peuvent conduire à la libération de composés vasoconstricteurs et prothrombotiques dans la circulation : les endotoxines, pouvant participer au choc terminal ^[311]. La rhabdomyolyse représente également un marqueur de sévérité de la maladie à virus Ebola, qui entraîne des perturbations des paramètres de coagulation et un choc terminal marqué ^[312,313]. De manière intéressante, la période pendant laquelle la concentration en CPK était élevée correspond à la période où les animaux étaient profondément asthéniques, ne pouvant plus se suspendre, voire même se maintenir debout. Cette observation clinique peut être associée à une défaillance ou à une souffrance musculaire et a participé à une forte augmentation du score clinique. Une augmentation de la lactate déshydrogénase (LDH), témoin de lésions tissulaires générales, a également été observée chez tous les animaux infectés, mais cette hausse était plus importante et plus précoce au cours des cas fatals tandis qu'elle était plus modérée chez les animaux survivants. Le profil de la sécrétion de LDH dans le plasma est proportionnel à la quantité de particules virales infectieuses présentes dans le sang, suggérant que le LASV est directement impliqué dans les dommages tissulaires menant aux altérations biochimiques. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au cours de l'étude de deux cas importés de FL, présentant un fort taux de LDH. Des différences frappantes ont ainsi été observées concernant les concentrations d'analytes associés aux dommages tissulaires. En effet, tandis que les niveaux d'AST, ALT, CPK et LDH ont augmenté fortement jusqu'à la mort dans les cas fatals, un profil différent a été observé chez les survivants, avec une hausse plus modérée et transitoire de ces facteurs entre J10 et J18 post infection, suivi par un déclin (excepté pour les taux de CPK qui ne varient pas au cours du temps). Ces observations suggèrent que le LASV induit

des dommages tissulaires modérés et sur une courte période de temps au cours des infections non létales. La forte sécrétion d'IL-6, observée uniquement chez les animaux moribonds, confirme cette observation. En effet, l'IL-6 est produite principalement par les monocytes/macrophages activés, et ce phénomène s'observe surtout dans le foie ^[314]. Cette sécrétion d'IL-6 reflète probablement les dommages tissulaires et la régénération hépatique, et peut, par conséquent, représenter un marqueur de sévérité de la maladie. Les forts taux d'IL-6 peuvent également être la conséquence de dommages tissulaires provenant d'autres organes étant donné la forte concentration d'AST. De plus, l'IL-6 peut être impliquée dans la pathogenèse, amplifiant la perméabilité des endothéliums et la fuite plasmatique ^[315].

Une élévation de la concentration en amylase a également été observée au cours des formes fatales de la maladie, intervenant pendant la phase terminale. Ce résultat peut signifier la présence d'une pancréatite aiguë. Jusqu'à présent, ce marqueur n'a pas été analysé chez l'Homme ou le primate au cours de la FL. Des niveaux d'amylase ont cependant été détectés à de fortes concentrations uniquement dans le plasma de patients décédés à la suite de l'infection par le virus Ebola Soudan ainsi que chez les patients infectés, peu importe l'issue de la maladie, au cours de l'épidémie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest ^[313,316]. Cette pancréatite, pouvant participer également à l'hypocalcémie observée chez les mêmes animaux, était probablement faible car même si des cellules infectées ont été détectées dans le pancréas des animaux infectés, nous n'avons noté aucune lésion histologique évidente. De plus, d'autres pathologies peuvent être associées à une augmentation de l'amylase sanguine, notamment l'inflammation des glandes salivaires ou des défaillances rénales. Nous avons observé une diminution de la concentration en albumine dans notre modèle au cours des deux issues de la maladie, avec un retour progressif à des valeurs physiologiques chez les survivants entre J12 et J28 post infection. Cette diminution peut refléter un défaut de fabrication d'albumine hépatique ou une sous-nutrition liée à l'anorexie. L'hypoalbuminémie peut également résulter de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et du « third spacing » précédemment suggéré. La balance en électrolytes est également perturbée au cours des formes fatales de FL. En effet, une hypocalcémie, une hypokaliémie et une hypochlorémie ont été observées uniquement dans le plasma des animaux morts de la maladie au cours de la phase aiguë. L'hypocalcémie n'a jamais été décrite chez les patients ou chez le primate infecté par LASV mais a cependant été décrite chez des patients décédés suite à l'infection par Ebola Soudan ^[316]. L'hypokaliémie a déjà été observée chez une cohorte de patients Nigériens infectés par LASV et a été associée à la mortalité de la FL ^[174]. Une kaliémie faible peut entraîner une

atteinte musculaire avec rhabdomyolyse et, dans certains cas, peut entraîner une arythmie cardiaque ^[317]. Il aurait été intéressant d'investiguer l'implication de ce phénomène sur le rythme cardiaque des animaux au cours des phases terminales. L'hypochlorémie observée peut être liée à la défaillance rénale précédemment observée, car les quantités d'ions chlorure dans le sérum sont régulées par le rein. En résumé, nous avons observé des différences marquées concernant les concentrations en électrolytes dans le sang entre les différentes issues de la maladie, avec une diminution dans la concentration en ions calcium, chlorure et potassium identifiée uniquement chez les animaux morts de la maladie.

Les troubles de la coagulation, qui représentent la signature des FHV, ne constituent pas un phénomène marqué dans la majorité des cas de FL humaine ^[201,227], et également chez le PNH ^[181,203]. Comme identifié auparavant chez les patients atteints de FL sévère et dans notre étude pilote, nous avons observé une thrombocytopenie modérée chez les animaux infectés démarant à J4 post infection et revenant à une valeur normale aux alentours de J15 post infection chez les survivants. L'intensité de ce phénomène n'a pas été différent entre les issues fatales et non fatales de la maladie ^[204,210,227]. Les changements les plus marqués ont été notés pour la fonction plaquettaire (pourcentage d'agrégation), fortement diminuée chez les patients et les primates infectés par LASV ^[210,227]. Ces études ont également montré l'absence de détection de produits de dégradation du fibrinogène (D-dimères) dans le plasma des patients et des primates, indiquant ainsi que la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) n'est pas un élément de pathogenèse ayant lieu au cours de la FL. Au cours de cette étude et pour des raisons pratiques, nous n'avons pas pu mesurer la fonction plaquettaire. Nous avons toutefois fait les mêmes observations que celles montrées précédemment, à savoir une absence de détection de D-dimères, une stabilité du taux de fibrinogène et une thrombocytopenie modérée chez les singes infectés, peu importe l'issue de la maladie, en accord avec l'absence de CIVD. De manière similaire à d'autres études réalisées chez le primate ^[203,210], nous avons observé une élongation modérée de l'APTT chez les animaux atteints d'une forme sévère de la maladie. Les valeurs de PT et les concentrations de fibrinogène sont, quant à elles, restées à un niveau basal, proche des animaux contrôles. Des valeurs d'APTT allongées avec des temps normaux de PT signifient généralement un défaut des facteurs impliqués dans la voie intrinsèque de la cascade de coagulation, notamment les facteurs XII, XI, IX et VIII. Ces facteurs (excepté le VIII) sont produits par le foie et peuvent donc indiquer une lésion hépatique affectant leur production. Le temps de thrombine (TT) est le temps nécessaire à une solution, dont la concentration en thrombine est normalisée, pour convertir le fibrinogène en fibrine, responsable

de la formation du caillot sanguin. Puisque le taux de fibrinogène est resté à des concentrations physiologiques au cours du temps, l'élévation du TT observée chez les animaux morts de la maladie peut indiquer la présence de dysfibrinogénémie acquise, rencontrée chez les patients atteints de maladie hépatique, et aboutissant à un défaut de formation du caillot sanguin ^[318]. De manière intéressante, les taux d'APTT et de TT étaient les plus élevés au cours des phases terminales de la maladie, à la période où une épistaxis modérée a été observée chez 2 des 6 animaux morts de l'infection par LASV. En résumé, les résultats rassemblés jusqu'à maintenant semblent montrer des perturbations de l'hémostase primaire chez les primates infectés par LASV, caractérisés par une thrombocytopenie modérée et une baisse de l'agrégation plaquettaire ^[210]. Nous avons pu également montrer que l'hémostase secondaire, ou coagulation, était également affectée au cours des formes fatales de FL dans notre modèle, et ce via une perturbation des facteurs impliqués dans la voie intrinsèque de la cascade de coagulation. Nous pouvons également confirmer que la CIVD est un phénomène absent au cours de la FL dans notre modèle, mais qu'une dysfibrinogénémie est un événement possible pour laquelle les causes sont inconnues. L'interprétation des résultats de coagulation est à prendre avec précautions, car tous les échantillons prélevés au cours des différents points de cinétique n'ont pas pu être testés immédiatement à la suite du prélèvement, pouvant entraîner des variations inter-échantillons. De plus, les kits utilisés pour la mesure des analytes sont sensibles et certains plasmas étaient de meilleure qualité que d'autres (hémolyse, faible volume...). Un schéma récapitulatif des données cliniques en fonction de l'issue de la maladie est présenté en **figure 63**.

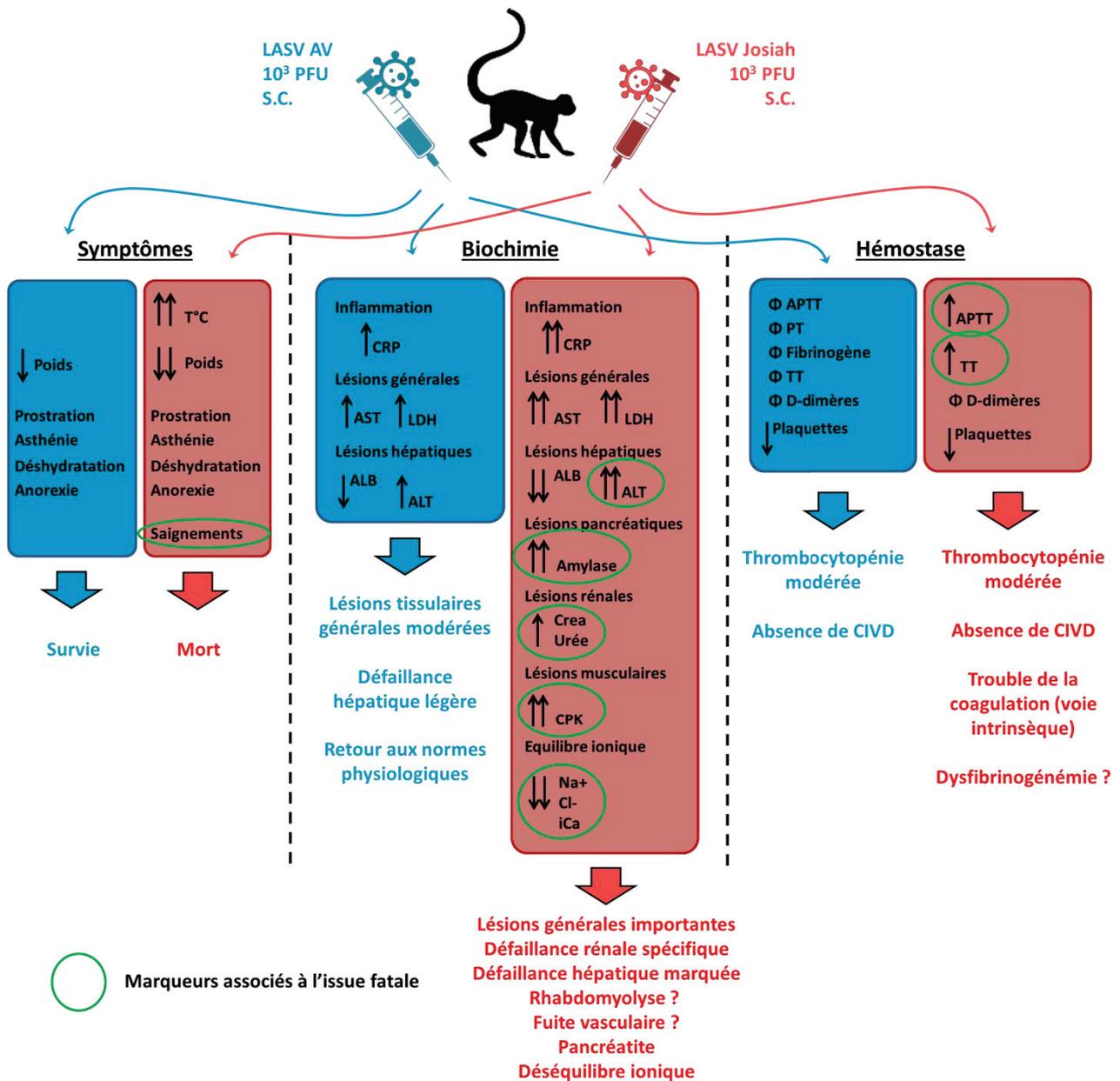


Figure 62 : Comparaison des données cliniques en fonction de l'issue de la maladie. Il est représenté ici la comparaison des symptômes, des valeurs biochimiques et des constantes de l'hémostase entre les animaux ayant survécu et ceux ayant succombé à la FL dans notre modèle animal. Les paramètres entourés en vert représentent des marqueurs associés à l'issue fatale de la maladie.

III. Le dynamisme viral et la physiopathogénèse

L'évolution du tropisme viral et de la dynamique de réplication depuis le site initial de l'infection jusqu'à la dissémination systémique et pantropique reste une énigme concernant la FL. L'étude de ces paramètres aux périodes très précoces et au pic de la maladie nous a permis de mettre en lumière les interactions virus-hôte se produisant au fur et à mesure de l'infection ainsi que d'identifier les compartiments dans lesquels le virus est le plus précocement détectable. Nous nous sommes également intéressés en parallèle aux modifications anatomopathologiques se produisant dans les organes au cours de l'infection afin de mieux comprendre la pathogénèse au cours de la FL. Notre modèle nous a permis également de comparer ces événements en fonction de la sévérité de la maladie.

Dans les périodes très précoces après l'infection (J2), nous avons observé la présence de titre infectieux uniquement dans la peau, au niveau du site d'injection de l'inoculum viral, chez tous les animaux infectés. Nous n'avons cependant pas observé de particules virales infectieuses ni d'ARN viral dans le plasma de ces animaux à la même période. L'injection ayant été faite par voie sous cutanée, ces résultats indiquent qu'il y a eu de la réplication virale dans le derme/épiderme. Notre laboratoire et d'autres équipes avons pu montrer que les CPA, sentinelles de la réponse immunitaire, étaient capables de répliquer le LASV *in vitro*, sans toutefois être activées ^[243]. Les DC présentes dans les tissus lymphoïdes à J7 post infection ont également été montrées comme étant une cible précoce du LASV lors de l'infection de singes cynomolgus ^[181]. Il est donc possible que les CPA résidentes dans le derme ou l'épiderme constituent les premières cibles virales, répliquant le virus avant la dissémination dans la circulation sanguine et lymphatique. Un marquage immunohistologique ciblant le virus et des marqueurs spécifiques des DC ou macrophages de la peau à cette période est crucial pour affirmer cette hypothèse et est en cours de réalisation dans notre laboratoire. La différence de titre infectieux dans la peau à cette période n'est pas significativement différente entre les animaux survivants et les animaux morts de la maladie, indiquant que la réplication du virus dans la peau est similaire entre J0 et J2 post infection parmi les formes sévères et non sévères de la maladie. Nous avons cependant détecté, dès J2 post infection, des traces d'ARN viral dans la plupart des organes des animaux morts de la maladie, alors que l'ARN n'a pas été détecté dans le sang. Ce résultat peut s'expliquer par une sensibilité de notre RT-qPCR plus importante dans les organes par rapport au sang. Il est donc possible que de l'ARN viral soit également présent dans le sang mais que nous n'ayons pas pu le détecter techniquement. Ce-

lui-ci a été détecté dans le sang plus tard, dès J3 post infection, ce qui corrèle avec la période de détection de matériel génétique viral au cours de l'étude pilote ^[204]. La quantité d'ARN viral à partir de J4 post infection, et jusqu'à la phase terminale de la maladie, était plus importante chez les animaux morts de la maladie que chez les animaux survivants, suggérant que la réplication virale a été plus importante au cours de l'issue fatale.

A J5 post infection, nous avons identifié des particules infectieuses principalement dans la peau et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate) des animaux infectés, et ce à des valeurs proches entre les animaux survivants et les animaux morts de la maladie. Aucune particule infectieuse n'a pu être détectée dans le sang des animaux infectés à cette période, suggérant fortement une réplication *in situ* dans les organes lymphoïdes secondaires, et ce, au cours des deux issues de la maladie. Cette réplication virale peut être à l'origine de la synthèse d'IFN-I observée chez tous les animaux infectés à J5 post infection. L'IFN-I peut en retour être associé à la déstructuration observée dans les ganglions des animaux survivants ou dans la rate des animaux morts de la maladie, comme cela a été montré au cours de l'infection de souris par LCMV ^[319]. Il est donc possible que les CPA, initialement infectées au niveau du derme/épiderme, aient migré dans la circulation lymphatique vers les organes lymphoïdes secondaires, entraînant une réplication secondaire *in situ*. Il est également possible que les particules virales produites au niveau de la peau aient migré dans les organes lymphoïdes secondaires où elles ont trouvé un environnement favorable à leur réplication. Comme nous l'avons observé à J2 post infection, la propagation de l'infection à J5 post infection chez les animaux infectés par une souche létale du LASV a été plus importante par rapport aux animaux survivants, comme le montrent les titres viraux observés dans plusieurs organes de la circulation systémique chez ces animaux. De manière surprenante, nous avons observé des traces d'inflammation dans le foie de tous les animaux infectés par la souche AV alors qu'aucun changement anatomopathologique n'a été détecté dans le foie des animaux infectés par la souche Josiah. Ces résultats peuvent suggérer la mise en place d'une réponse immunitaire très précoce chez les animaux survivants, ayant lieu avant que la production de particules virales ne soit détectable. Entre J5 et J11 post infection, la virémie apparaît dans la circulation sanguine des animaux infectés, témoignant d'une réplication virale dans les tissus et de la circulation de particules infectieuses dans le sang. Cette virémie a été détectée plus précocement et a augmenté plus fortement chez les animaux morts de la maladie, tandis que celle-ci a été contrôlée à partir de J12 post infection chez les survivants. Il y a donc une corrélation positive entre la vitesse d'apparition et l'intensité de la virémie plasmatique et la gravité de la

maladie dans notre modèle, comme précédemment montré au cours de l'étude pilote, chez le singe rhésus et chez l'Homme [204,209,225]. L'issue de la maladie peut également être reliée à la proportion de particules défectives au cours de l'infection. En effet, une quantité importante de particules défectives sont produites pendant la réplication des virus à ARN négatifs [320], et cela a été également montré pour LCMV et d'autres Arénavirus [321,322]. Ces particules défectives interfèrent avec la production de particules infectieuses et peuvent être associées à l'induction d'une réponse immunitaire innée plus importante [23]. Nous avons observé une diminution du nombre de particules défective dans le sang au cours de la phase terminale de maladie chez les animaux moribonds, montré par la diminution du ratio ARN/titre. Une amélioration de l'efficacité de réplication, entraînant une baisse du nombre de particules défectives, a donc été identifiée au cours de l'issue fatale dans notre modèle. L'interprétation est difficile chez les animaux survivants, car il y a un manque de points de cinétique où l'ARN et le titre infectieux était détectable. De plus, nous avons observé de fortes variations pour un animal, rendant difficile l'analyse pour cette cohorte.

L'étude de la charge virale à J11, c'est-à-dire au pic de la phase aiguë de la maladie, a montré de fortes disparités entre les issues fatales et non fatales. Nous avons observé chez les survivants des quantités modérées d'ARN viral dans tous les organes et la présence de virus infectieux principalement dans le foie et les organes lymphoïdes primaires et secondaires, et dans quelques organes de la circulation systémique. Ces résultats montrent la présence d'une infection disséminée dans la plupart des organes mais que la réplication est contrôlée chez les survivants. Cette observation est confirmée par l'absence de lésions générales dans les organes systémiques (hormis une inflammation des poumons toujours persistante chez certains animaux). Seuls les organes lymphoïdes secondaires, présentant du titre infectieux, ont montré des changements histopathologiques (déstructuration des follicules, apparition de macrophages à corps tingibles, substance amyloïde au centre des follicules spléniques). Les études histopathologiques réalisées jusqu'à maintenant au cours des infections par le LASV chez le primate ont été réalisées uniquement au cours des autopsies chez les animaux fatalement infectés et ne montrent pas les changements observés au cours des formes non fatales. Une seule étude s'est intéressée à l'étude des changements anatomopathologiques dans les organes à J7 post infection et au cours de la phase terminales entre J10 et J17 post infection [181]. Cependant, la dose injectée était de 3000 PFU de LASV-Josiah en intramusculaire, une dose supposée être fatale chez le singe.

Les résultats obtenus chez les animaux développant une forme fatale de la maladie ont été radicalement différents. Ces animaux ont été euthanasiés après l'atteinte du point limite de souffrance, entre J11 et J15 post infection. La quantité d'ARN viral et de titre infectieux ont été identifiés à de forts taux dans tous les organes testés, excepté l'urine. Du virus infectieux a également été détecté dans le SNC (cerveau, LCR, cervelet) à des taux plus modérés. Ces résultats indiquent que tous les compartiments ont produit des particules virales infectieuses. Ces résultats confirment donc que la réplication virale est pantropique et incontrôlée au cours de l'issue fatale ^[67,199,209,213]. De manière intéressante, de l'ARN viral sans particules infectieuses ont été détectées dans l'urine, signifiant que celle-ci ne serait que peu contaminante. Cette présence d'ARN dans l'urine peut résulter de la filtration de matériel génétique viral présent initialement dans le sang, ou encore d'une inactivation du virus due à la composition et au pH acide de l'urine ^[323].

Au cours de l'issue fatale, le foie représentait un réservoir de réplication viral lors des étapes terminales. En effet ce compartiment contenait un des plus hauts titres infectieux mesuré et le plus faible nombre de particules défectives identifié. Ceci corrèle avec la forte inflammation du parenchyme hépatique, avec le tropisme privilégié du virus pour les hépatocytes et avec l'élévation des concentrations en AST/ALT et ALB observé chez ces animaux à cette période. Nos résultats corrèlent avec ceux obtenus précédemment chez l'Homme et le PNH, montrant que le foie était l'un des organes les plus fortement affectés ^[182,183,213]. Comme précédemment décrit au court des issues fatales chez l'Homme et le primate ^[181,204,235], de fortes concentrations en IL-6 ont également été observées spécifiquement chez les animaux moribonds dans les stades terminaux. La production d'IL-6 est cruciale à la régénération des hépatocytes et peut donc être corrélée à la régénération hépatique observée au cours de ces cas fatals ^[314]. De manière intéressante, aucune modification anatomopathologique n'a été observée dans le foie chez les animaux survivants à J11 post infection, et un seul animal sur trois présentait un titre infectieux. De plus, la sécrétion d'AST/ALT chez ces animaux était modérée et nous n'avons pas observé d'IL-6, démontrant que l'infection du foie est contrôlée chez ces animaux à J11 post infection.

La nécrose modérée des glandes surrénales est un phénomène caractéristique observé au cours de la FL chez l'Homme et l'animal ^[179,199,208,209,213]. Bien qu'aucune modification anatomopathologique évidente n'ait été observée dans notre modèle, les glandes surrénales présentaient le titre infectieux le plus élevé chez les animaux morts de la maladie. L'immunomarquage viral de ces animaux a révélé la présence de nombreux foyers d'infection au niveau de la zone

glomérulée et de la zone fasciculée. De manière intéressante, ces zones sont respectivement responsables de la synthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes. Les minéralocorticoïdes, et dans une moindre mesure les glucocorticoïdes, sont impliqués dans le maintien de la pression artérielle via la régulation hydrosodique ^[324]. Les minéralocorticoïdes ont également un rôle direct sur les tissus cardiovasculaires. Ainsi, la réplication virale dans les glandes surrénales peut avoir affecté la production de ces hormones, menant à la perturbation de la pression artérielle et contribuant à l'évolution vers le choc terminal. Nous avons également observé dans les différents organes, notamment le thymus, le rein, le pancréas, le cerveau et le cœur, que l'endothélium était régulièrement la cible du virus. L'infection des cellules endothéliales a pu causer de légères lésions au niveau vasculaire aboutissant également à la fuite plasmatique et à la perturbation de l'hémostase observé au cours de la FL.

Des infiltrats inflammatoires riches en lymphocytes, plasmocytes et macrophages ont été observés dans le rein seulement au cours de l'issue fatale. Une inflammation modérée a été concomitante à l'augmentation des taux d'urée et de créatinine chez les singes moribonds et un nombre important de cellules infectées ont été reportées au niveau de la jonction cortico-médullaire rénale. Les atteintes rénales n'ont été que peu observées chez l'Homme ^[180] et chez le macaque ^[204,213] et semblent spécifiques de l'issue fatale dans notre modèle.

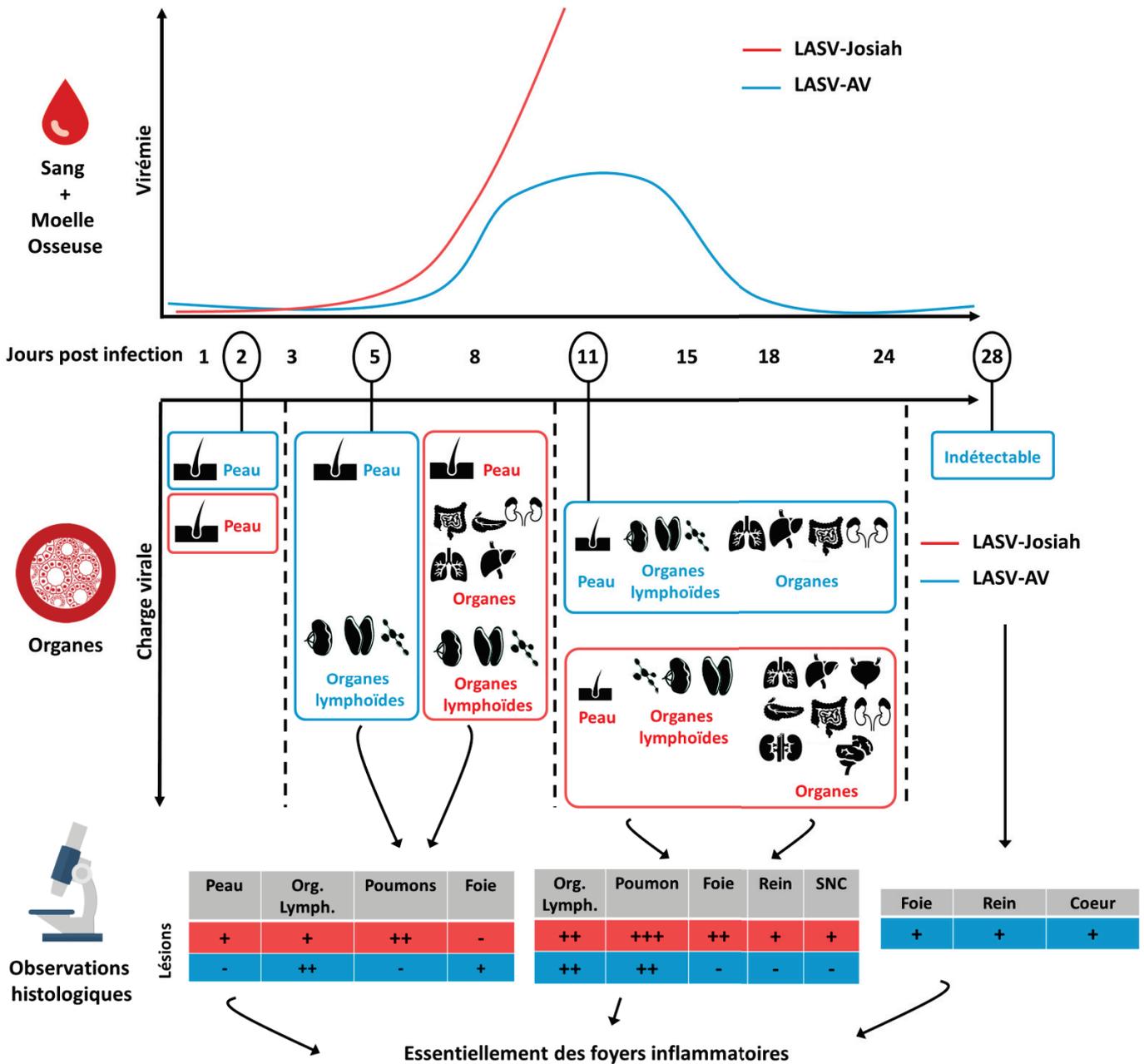
Comme cela a été décrit chez l'Homme ^[179], nous avons observé une déstructuration des follicules lymphoïdes dans les ganglions, et ce chez tous les animaux, caractérisés par la disparition des follicules germinatifs, et la présence de nombreux macrophages à corps tingibles. Ces modifications anatomopathologiques sont intervenues au moment où du virus infectieux a été détecté dans ces organes, chez tous les animaux infectés, suggérant que la réplication virale en est la cause directe ou indirecte. Nous avons également observé l'apparition de substances amyloïdes au centre des follicules spléniques chez tous les animaux infectés, pouvant résulter de l'apoptose des lymphocytes les constituant, ce qui est confirmé par la hausse de la proportion de lymphocytes T apoptotiques chez tous les animaux infectés à cette période. Cette amylose étant présente au cours des deux issues de la maladie, son rôle dans la pathogenèse doit être clairement étudié.

Le poumon a été l'un des organes les plus marqués au niveau histologique, avec l'apparition d'une pneumonie interstitielle sévère et d'une infiltration de cellules immunitaires, chez tous les animaux moribonds et chez un seul animal survivant. Ces résultats confirment les observa-

tions précédemment obtenues chez l'Homme ^[182] et le singe ^[181,204,213] et sont intervenues de manière concomitante avec la détresse respiratoire observée chez les animaux.

Enfin, nous avons détecté des signes d'inflammation dans le SNC au cours de l'issue fatale, caractérisés par des infiltrats de cellules mononucléées et une activation des microglies, ce qui corrèle avec l'augmentation du titre viral dans ces organes au même temps. Seul de l'ARN viral a été détecté à de faibles quantités dans le cerveau et le cervelet des animaux survivants, ce qui suggère que l'atteinte du SNC est associée à un pronostic défavorable. De manière intéressante, l'analyse transcriptomique a montré chez ces animaux une surexpression de gènes impliqués dans le système neuronal, notamment le gène MYH14. Ce gène code pour un membre de la superfamille des myosines fortement exprimée dans la cochlée. Deux mutations dans ce gène ont été identifiées chez tous les patients atteints d'une perte de l'audition héréditaire, indiquant que MYH14 a un rôle crucial dans les fonctions auditives ^[325]. Il serait intéressant d'étudier l'implication de ce gène dans les phénomènes de surdité observé chez les survivants de la FL.

Nous avons observé chez les animaux survivants en début de convalescence la persistance d'ARN viral dans les organes et une absence de particules virales infectieuses, signifiant un contrôle de la réplication chez ces animaux. La pression organisée par les cellules immunitaires résidentes dans les organes, lysant les cellules infectées, peuvent expliquer pourquoi nous avons observé la présence d'ARN mais pas de titre viral. Cette réponse immunitaire persistante dans les organes peut être la cause des signes d'inflammation observés dans certains d'entre eux, notamment le foie, le rein, le cœur et le cerveau. De manière intéressante, le contrôle de la réplication virale dans les organes des animaux survivants corrèle avec le contrôle de la réplication dans le sang, le retour à la normale des constantes biochimiques, le nombre élevé de lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ et la disparition des symptômes. Un schéma récapitulatif de la dynamique virale et de la physiopathogenèse en fonction de l'issue de la maladie est présenté en **figure 63**.



?
Perspectives

- Les CPA sont elles les premières cibles au niveau du site d'infection ?
- Nature des cellules infectées dans le SNC ?
- Rôle de l'infection sur l'hématopoïèse ?
- Quelles sont les réponses immunitaires dans les tissus ?

Figure 63 : Comparaison du tropisme viral et de la physiopathogenèse en fonction de l'issue de la maladie. Il est représenté ci-dessus l'évolution de la virémie dans le sang et dans la moelle osseuse au cours du temps parmi les deux issues rencontrées par notre modèle. Il est également représenté en dessous la dynamique virale dans les organes chez les mêmes animaux ainsi que l'importance des lésions observées en fonction de la sévérité de la maladie. En bas sont listées les questions qui demeurent en suspens.

IV. Le système immunitaire

Les réponses immunitaires ont été peu caractérisées dans les modèles animaux, en particulier chez le PNH. Il ressort néanmoins de ces études qu'une réponse immunitaire à médiation cellulaire est corrélée à la survie, ce qui n'est pas le cas pour la réponse humorale ^[204,211,212]. Dans cette thèse, nous avons tiré profit de notre modèle animal pour caractériser les réponses immunitaires innées et adaptatives se produisant au cours des issues fatales et non fatales de la FL.

IV.1. La réponse immunitaire innée

Concernant l'immunité innée, une lymphopénie des cellules NK a été observée chez les animaux survivants. Chez ces derniers, le nombre de monocytes a diminué et le nombre de cellules dendritiques myéloïdes n'a pas varié au cours des 11 premiers jours de l'infection. Cependant, nous avons observé que ces deux populations de CPA étaient progressivement activées avec un pic d'activation située à J8 post infection. Au contraire, au cours de l'issue fatale, nous avons noté une augmentation importante et transitoire du nombre de monocytes et de cellules dendritiques myéloïdes. Celles-ci ont également montré une forte activation progressive au cours de la maladie, mais plus tardive que chez les animaux survivants. De manière intéressante, le pic d'activation des CPA est intervenu en aval de la réplication virale dans le plasma (observée à J6 post infection) au cours de l'issue fatale tandis que ce pic est intervenu avant chez les animaux survivants. Il y a donc un retard d'activation des CPA, principalement des monocytes, au cours de l'issue fatale. Ce retard d'activation peut être impliqué dans l'absence de contrôle de la réplication virale et dans la réponse immunitaire adaptative délétère mise en place chez les animaux morts de la maladie. Une observation similaire a été faite au cours de l'étude pilote, avec une forte augmentation de monocytes CD80+ dans les phases précoces des animaux survivants, et une faible augmentation chez les animaux morts de la maladie ^[204]. L'issue fatale de la maladie a été caractérisée par la forte production dans les phases terminales de CCL2, CCL4, TNF- α , IL-6, IL12/23, GM-CSF, VEGF, IL-1RA et IL-10. L'issue non fatale a été associée avec une production modérée et contrôlée de CCL2, IL-8, IL-15, IL-1RA et IL-10. La plupart de ces médiateurs de l'inflammation, notamment CCL2, TNF- α , IL-6, IL12/23, GM-CSF sont des cytokines produites principalement par les DC matures et les macrophages ^[326]. Par conséquent, la forte augmentation du nombre de mDC et de monocytes observée au cours des phases précoces de l'issue fatale et leur forte

activation peut être associée à la production incontrôlée de cytokines. Par ailleurs, une réponse inflammatoire non contrôlée a été associée avec un pronostic défavorable et a déjà été décrit au cours de différentes épidémies liées au virus Ebola ^[232], mais pas au cours de la FL ^[181,204,235]. De plus, ces observations sont en accord avec une étude portant sur les réponses inflammatoires chez des patients infectés par le virus Ebola, dans laquelle il a été montré que la guérison était associée avec une réponse inflammatoire bien contrôlée, importante pour le contrôle de la réplication virale et l'induction d'une immunité spécifique, tandis qu'une réponse inflammatoire défectueuse et l'activation massive des monocytes/macrophages étaient associées à l'issue fatale ^[327]. La réplication virale qui a lieu dans les phases précoces de la maladie peut donc représenter le point de départ d'une réponse inflammatoire non contrôlée. Les dommages, minimes, causés par le virus peuvent ensuite être décuplés par ceux causés par le choc cytokinique. La forte activation des CPA observée dans notre modèle est en contradiction avec les études réalisées *in vitro* en faveur d'un blocage du rôle et de l'activation des CPA lors de leur infection par LASV ^[145,248]. Cette différence peut s'expliquer par un contexte infectieux différent entre les études *in vivo* et *in vitro*. En effet, l'infection avec une forte dose du LASV *in vivo* peut entraîner la génération de nombreux PAMP dans le microenvironnement proche du site d'injection et une lésion des tissus générant des DAMP. Cette saturation de PAMP et de DAMP amène à l'activation des PRR ^[328] et à la forte activation des CPA résidentes, qui vont alors exprimer les marqueurs de costimulation CD80 et CD86. Ce phénomène peut ne pas se produire dans des systèmes de culture comportant un seul type de population cellulaire. En effet, ces systèmes entraînent l'infection de toutes les cellules, dans lesquelles le virus peut interférer avec la réponse inflammatoire.

Un rôle important de la réponse IFN dans le contrôle de l'infection a été démontré au cours de l'étude pilote, avec une élévation précoce du taux d'IFN- α chez les animaux survivants et une élévation tardive au cours des phases terminales chez les animaux moribonds ^[204]. Cependant, au cours de cette étude, nous avons observé un pic de sécrétion d'IFN- α entre J6 et J10 post infection au cours des deux issues de la maladie. Ce résultat peut s'expliquer par la différence de technique utilisée (ELISA/Luminex) et par l'origine différente des singes parmi les deux études. Ici, la réponse IFN-I seule n'a pas été associée à la différence de sévérité de la maladie dans notre modèle. Nous avons également identifié une augmentation précoce de la sécrétion d'IL-15 chez tous les animaux infectés. Une forte concentration en IL-15 a été notée chez des patients décédés au cours d'infections par les virus Ebola et CCHF, mettant en évidence un profil d'expression de cytokines différent parmi les FHV et donc une spécificité de la réponse

inflammatoire de la FL dans notre modèle ^[329,330]. Au cours de l'issue fatale, 3 chimiokines ont été fortement produites, notamment CCL2, CCL4 et IL-8. Ces chimiokines peuvent avoir un effet sur la perturbation de l'hémostase en affectant l'intégrité de l'endothélium, notamment pour permettre le chimiotactisme et la traversée des leucocytes vers le tissu inflammé ^[331]. De plus, les chimiokines perpétuent la réaction inflammatoire en promouvant la synthèse de cytokines inflammatoires, notamment IL-1, IL-6 ou le TNF- α ^[331]. La hausse des chimiokines observée au cours de l'issue fatale peut donc être en partie responsable des troubles de l'hémostase menant au choc terminal. Par ailleurs, il a été suggéré que l'IL-8, connue pour son rôle attracteur des neutrophiles ^[332], était impliquée dans la neutrophilie chez des patients infectés par LASV ^[235]. De manière intéressante, une hausse dans la production d'IL-8 a été identifiée très précocement à J1 post infection au cours de l'issue fatale tandis que sa sécrétion a été identifiée plus tardivement chez les survivants. Bien que nous n'ayons pas pu mesurer le nombre de neutrophiles circulants, ces données suggèrent qu'une neutrophilie précoce pourrait être associée à une forme grave de la maladie. Cette hypothèse se confirme dans les données du transcriptome, où les voies de signalisation impliquées dans la dégranulation des neutrophiles étaient surexprimées à J2 post infection chez les animaux morts de la maladie, et dans une moindre mesure chez les animaux survivants. En plus de leur rôle dans la réponse immunitaire innée, CCL2, CCL4, TNF- α , IL-6, IL-12/23, GM-CSF, VEGF, IL-1RA, IL-2 et IL10 (à de fortes concentrations) ont été détectées spécifiquement dans le plasma au cours de l'issue fatale, et représentent par conséquent un marqueur prédictif d'une maladie sévère. Au contraire, le granzyme B, sCD40-L et IL-5 ont été associés spécifiquement à la survie dans notre modèle animal.

IV.2. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative chez les animaux survivants a été caractérisée par une lymphopénie transitoire des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ entre J4 et J10 post infection. La cause de cette lymphopénie n'est pas claire, mais il a été montré que l'IFN-I et le TNF- α jouaient un rôle dans la délétion transitoire des lymphocytes B et T pendant les infections virales, y compris les infections par LCMV ^[333-335]. Il est donc probable que des phénomènes similaires se produisent au cours de la FL. Une lymphocytose des lymphocytes T-CD8⁺, et dans une moindre mesure des T-CD4⁺, a été observée dès J8 post infection chez les animaux survivants, ce qui correspond de manière intéressante au pic d'activation des CPA précédemment observée chez ces mêmes animaux. Cette lymphocytose a été concomitante à la forte

augmentation du pourcentage de cellules T proliférantes, dans les phases tardives de l'infection. L'activation des monocytes et des mDC s'est également déroulée de manière simultanée avec l'augmentation de la proportion de lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ exprimant le marqueur d'activation CD69, suggérant une communication entre ces cellules et soulignant le rôle important joué par les CPA au cours des phases précoces de la FL pour l'élaboration de la réponse immunitaire adaptative. L'augmentation des concentrations de sCD137 et de sCD40L dans le sang, molécules exprimées à la membrane puis sécrétées en réponse à l'activation des lymphocytes T activés, est également en faveur de l'activation de la réponse immunitaire chez les animaux survivants ^[336,337]. De manière intéressante, le sCD40L a également été identifié chez les patients infectés par le virus Ebola, et corrélé à la survie ^[338]. sCD40L est également produit par les plaquettes activées ^[339]. Par conséquent, l'augmentation de sCD40L observée chez les animaux survivants, entre J4 et J8 post infection, pourrait correspondre à un mécanisme de réparation des endothéliums altérés par l'infection. En parallèle de leur activation, nous avons noté l'acquisition d'activité cytotoxique chez les deux populations lymphocytaires, avec notamment une augmentation de la proportion de cellules T-CD4⁺ et T-CD8⁺ exprimant la perforine. Alors que cette augmentation est transitoire au cours de la phase aiguë de la maladie pour les lymphocytes T-CD4⁺, celle-ci augmente progressivement au cours de la progression de la maladie pour les T-CD8⁺. De manière intéressante, la hausse de cellules T-CD8⁺ exprimant granzyme B a coïncidé avec l'apparition de la virémie chez les animaux survivants, les deux se produisant entre J6 et J18 post infection. Ces résultats suggèrent que la réponse T cytotoxique est impliquée dans le contrôle de la virémie. Ces résultats confirment ceux obtenus au cours de l'étude pilote, dans laquelle la circulation de lymphocytes T activés avait été observé dans le sang des animaux survivants ^[204]. La forte activation de la réponse T chez les survivants a été également confirmée par la forte production de perforine et de granzyme B dans le sang des animaux, dont le pic de production corrèle avec le pic de virémie plasmatique. Ces résultats reflètent une lyse tissulaire spécifique des lymphocytes T, dont les produits de lyse ont été solubilisés dans le sang ^[340]. La forte réponse immunitaire des lymphocytes T développée par les animaux survivants a également été observée dans les organes lymphoïdes secondaires, notamment la rate, les ganglions inguinaux proche du site d'infection et les ganglions mésentériques, plus éloignés. En effet, de façon chronologique, nous avons observé une activation des lymphocytes T helper et T cytotoxiques au cours des phases précoces dès J2 et J5 post infection, en particulier dans les deux types de ganglions. Cette activation a été suivie par une prolifération de ces cellules dès J5 post infection, atteignant un pic à J11 post infection et toujours présente pen-

dant la phase de convalescence. Nous avons cependant noté une apoptose de ces cellules entre J5 et J11 post infection. A J11 post infection, les cellules T-CD8+, et dans une moindre mesure les cellules T-CD4+, ont acquis de fortes propriétés cytotoxiques, illustrée par l'expression de perforine et de granzyme B. Il a été observé dans la même période une augmentation de la proportion de cellules matures, exprimant le récepteur Fas (CD95). Dans l'ensemble, l'issue non fatale développée par notre modèle animal a été associée à l'établissement d'une réponse immunitaire T helper et T cytotoxique robuste, caractérisée dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires par une activation précoce intervenant au départ de la virémie, l'acquisition de propriétés cytotoxiques au pic de la virémie, et à une prolifération initiée pendant la phase aiguë de la maladie et perdurant jusqu'à la convalescence.

Un profil radicalement différent a été observé au cours de l'issue fatale. En effet, chez ces animaux, nous avons noté une lymphopénie des lymphocytes T-CD4+ et T-CD8+ au cours des phases précoces. Cependant alors que la lymphocytose était initiée à J8 post infection chez les survivants, celle-ci n'a pas été observée au cours des phases terminales chez les animaux moribonds. La réponse immunitaire chez ces animaux a été caractérisée par l'absence de prolifération des lymphocytes T, l'absence d'activation des cellules T-CD4+ et une activation des lymphocytes T-CD8+ plus faible que chez les survivants. Ces cellules n'ont pas montré de cytotoxicité hormis une faible et tardive augmentation des lymphocytes T-CD8+ exprimant le granzyme B. Au contraire, une forte apoptose de ces populations lymphocytaires a été observée entre J6 et J10 post infection, soulignant une immunosuppression au cours de l'issue fatale. Cette apoptose semble coïncider avec la hausse des cellules T-CD8+ et T-CD4+ exprimant le marqueur d'anergie PD-1 (CD279). PD-1 est un corécepteur dont le rôle décrit est de réguler négativement la réponse des cellules T et B une fois que celles-ci sont activées, atténuant ainsi l'ampleur de la réponse immunitaire au cours des infections virales aiguës ^[341]. Une étude a montré que PD-1 était surexprimé à la surface des lymphocytes T chez des souris infectées de manière chronique par LCMV et que le blocage transitoire de son expression à la surface des cellules a suffi à restaurer la fonction des cellules T, amenant au contrôle de la réplication virale ^[342]. Par ailleurs, PD-1 a également été identifié comme un marqueur de mortalité au cours de l'épidémie Ebola en Guinée ^[343]. Ces résultats indiquent que la dérégulation de la réponse T, marquée par une anergie des cellules T-CD4+ et T-CD8+, est un phénomène clé impliquée dans l'immunopathogenèse au cours de la FL. Nous avons identifié chez les animaux moribonds une élévation de la concentration de plusieurs cytokines pro-

duites en partie par les cellules T, notamment la perforine, sCD137, sCD40L, IFN- γ , et IL-2. Étonnamment, la perforine a été détectée dans le plasma de ces animaux alors que celle-ci n'a pas été exprimée par les lymphocytes T circulants. En revanche, cette sécrétion dans le plasma coïncide dans le temps avec l'augmentation de cellules T-CD8⁺ exprimant la perforine dans la rate et dans une moindre mesure dans les ganglions. Il est donc possible que la hausse de perforine retrouvée dans le sang soit la conséquence d'une fonction cytotoxique exercée dans les tissus. Il est également possible que cette sécrétion provienne des cellules NK, possédant de fortes activités cytotoxiques ^[340]. Nous n'avons cependant pas été en mesure de caractériser précisément le rôle des cellules NK au cours de cette étude. En effet, les combinaisons de marqueurs utilisés ne nous ont pas permis de sélectionner les cellules NK dans les panels d'activation et de fonction cytotoxique. La production de perforine, sCD137, sCD40L, IFN- γ et IL-2 est en faveur d'une activation des populations T. En revanche, celle-ci ne parvient pas à contrôler efficacement la réplication. Cette observation pourrait refléter un rôle supplémentaire de la réponse T dans la pathogenèse. En effet, la réplication virale incontrôlée dans les tissus et dans le sang dans les phases terminales a pu aboutir à la génération de PAMP et de DAMP stimulant de manière trop importante les cellules T et les CPA. Cette stimulation a pu entraîner une production excessive et incontrôlée de cytokines, observée chez ces animaux au cours des phases tardives ainsi que l'épuisement et l'apoptose des lymphocytes T, aboutissant à une réponse immunitaire délétère et renforçant *in fine* la pathogenèse. Plusieurs études sont en faveur d'un rôle contradictoire de la réponse T, pouvant protéger contre l'infection par LASV, mais pouvant également accroître la pathogenèse. En effet, des souris exprimant un CMH-I humanisé n'ont plus été capables de contrôler l'infection par LASV et la suppression des cellules T dans ces souris infectées par LASV a empêché l'activation des macrophages, la survenue de la maladie, et ce, indépendamment de la virémie. Ces résultats suggèrent que la réponse inflammatoire médiée par les cellules T contribue à la pathogenèse ^[191]. Une autre étude a montré que la déplétion du répertoire T-CD8⁺ dans des souris permettait de les sauver d'une infection létale par LASV et que cette réponse T-CD8⁺ était liée à la fuite vasculaire dans ce modèle, suggérant un rôle pathologique des lymphocytes T-CD8⁺ dans la FL ^[344]. Enfin, il a été montré dans un modèle de souris infectées par un Arénavirus pathogénique de singe, le LCMV-WE, que le choc cytokinique était accompagné d'une production d'oxyde nitrique. L'infection de souris déficiente de la forme inductible d'oxyde nitrique synthase (iNOS) a empêché la survenue des symptômes de la maladie alors que le choc cytokinique était toujours présent. L'iNOS a été surexprimé par les macrophages du foie d'une manière dépendante de l'IFN- γ . Le blocage de l'IFN- γ ou la déplétion des lymphocytes T a alors suffi

à diminuer la synthèse d'iNOS hépatique et à empêcher la maladie, malgré une virémie élevée, suggérant une nouvelle fois que la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes T peut avoir un rôle délétère au cours de la FL ^[345]. Bien que les modèles utilisés dans les études diffèrent du modèle primate actuel, ces observations et les nôtres suggèrent qu'un défaut de contrôle des lymphocytes T entraîne une réplication virale incontrôlée et un emballement de la maladie menant au choc terminal et à la mort des animaux.

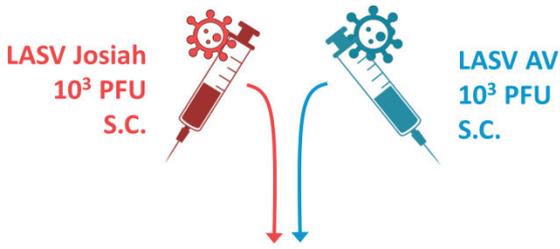
Un défaut de réponse immunitaire a également été observé dans les organes lymphoïdes, avec une activation retardée des lymphocytes T-CD4⁺ et T-CD8⁺ dans la rate et une activation plus faible dans les ganglions par rapport aux animaux survivants. Tout comme les singes survivants, la prolifération des cellules T a été observée dans la rate des animaux moribonds à J11 post infection. En revanche celle-ci était plus faible et présente uniquement à J11 post infection dans les ganglions. De manière intéressante, les propriétés cytotoxiques des lymphocytes T étaient plus faibles dans les ganglions des animaux moribonds par rapport aux animaux survivants. De plus nous avons observé une apoptose de ces cellules dès J2 post infection et maintenue jusqu'à l'euthanasie des animaux. Enfin, nous n'avons observé aucune maturation des lymphocytes T-CD8⁺ (CD8⁺ CD95⁺). Dans l'ensemble, l'issue fatale développée par notre modèle animal a été associée à une faible réponse immunitaire, caractérisée dans le sang et dans les organes lymphoïdes secondaires par une faible activation des cellules T-CD8⁺ intervenant au départ de la virémie, par l'absence d'acquisition de propriétés cytotoxiques dans le sang et une faible cytotoxicité dans les ganglions ainsi que par l'absence de prolifération dans le sang et une faible prolifération dans les organes lymphoïdes secondaires au cours des phases terminales. De plus, l'issue fatale a été caractérisée par une anergie touchant les deux populations lymphocytaires, et pouvant être en partie responsable de l'emballement de la réplication.

IV.3. La réponse humorale

Le contrôle de l'infection ne semble pas corrélé à l'induction d'anticorps neutralisants, que ce soit chez l'Homme ou chez le macaque ^[76,207]. En effet, au cours de cette étude, nous n'avons pu détecter que de faibles taux d'anticorps neutralisants chez deux animaux survivants, et ce, seulement un mois après l'infection (données non présentées). Ces anticorps n'ont pas été détectés non plus au cours de l'étude pilote ^[204]. Il semble donc que la survie ne soit pas associée à une séroneutralisation du virus. Des études ont également suggéré que la présence d'IgG et d'IgM n'était pas corrélée avec la sévérité de la maladie chez le singe et chez

l'Homme ^[209,211,225]. Cependant, nous avons détecté la présence d'IgM et d'IgG chez tous les animaux infectés, mais ceux des animaux morts de la maladie sont apparus plus précocement et ont augmenté plus rapidement, suggérant que la charge virale plus élevée chez ces animaux a peut-être stimulé de manière plus intense l'induction de la réponse humorale. Le suivi de la dynamique des lymphocytes B a mis en évidence des différences entre les deux formes de la maladie, avec une lymphopénie suivie d'une lymphocytose et l'apparition de cellules B activées au cours des phases tardives de la maladie chez les survivants tandis que seule une lymphopénie a été observée chez les animaux morts de la maladie. De manière intéressante, la proportion de lymphocytes B activés dans les organes lymphoïdes secondaires a été plus importante et plus précoce (dès J2 post infection) au cours de l'issue fatale par rapport à l'issue non fatale. La période d'activation des lymphocytes B dans les organes semble coïncider avec la période d'apparition des anticorps IgM et IgG, ce qui suggère que la réponse B participe à limiter la réplication virale mais que celle-ci, seule, ne permet pas de contrôler l'infection. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation similaire de la proportion de cellules B matures dans les organes lymphoïdes au cours du temps chez tous les singes infectés. Il serait alors nécessaire d'identifier contre quelles protéines virales sont dirigés les anticorps circulant afin de mettre en évidence un éventuel rôle de la spécificité des anticorps dans le contrôle de la réplication virale et la guérison. Un schéma récapitulatif de la comparaison des réponses immunitaires en fonction de l'issue de la maladie est présenté en **figure 64**.

Figure 64 : Comparaison des réponses immunitaires en fonction de l'issue de la maladie. La réponse inflammatoire, immunitaire innée et adaptative (cellulaire et humorale) ont été schématisées ci-après et comparées entre les formes sévères et non sévères de la maladie. Les cercles en vert représentent des marqueurs associés à la forme fatale de la maladie. L'astérisque (*) signifie qu'une réponse globalement similaire a été observée dans les organes lymphoïdes (ganglions inguinaux, ganglions mésentériques et rate).



○ Marqueurs associés à l'issue fatale

Inflammation

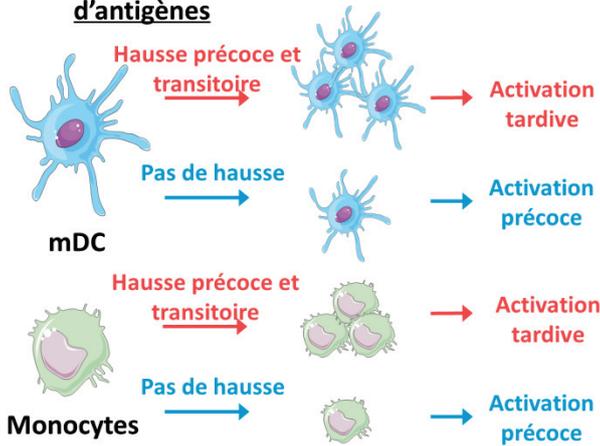
Cytokines	Morts	Survivants
CCL2	+++	+
CCL4	++	-
IL-8	++	+
IFN- α	+	+
TNF- α	++	-
IL-15	+	+
IL-6	+++	-
IL-12/23	++	-
GM-CSF	++	-
VEGF	++	-
IL-1RA	+++	+
IL-10	++	+

↓ Choc cytokinique délétère

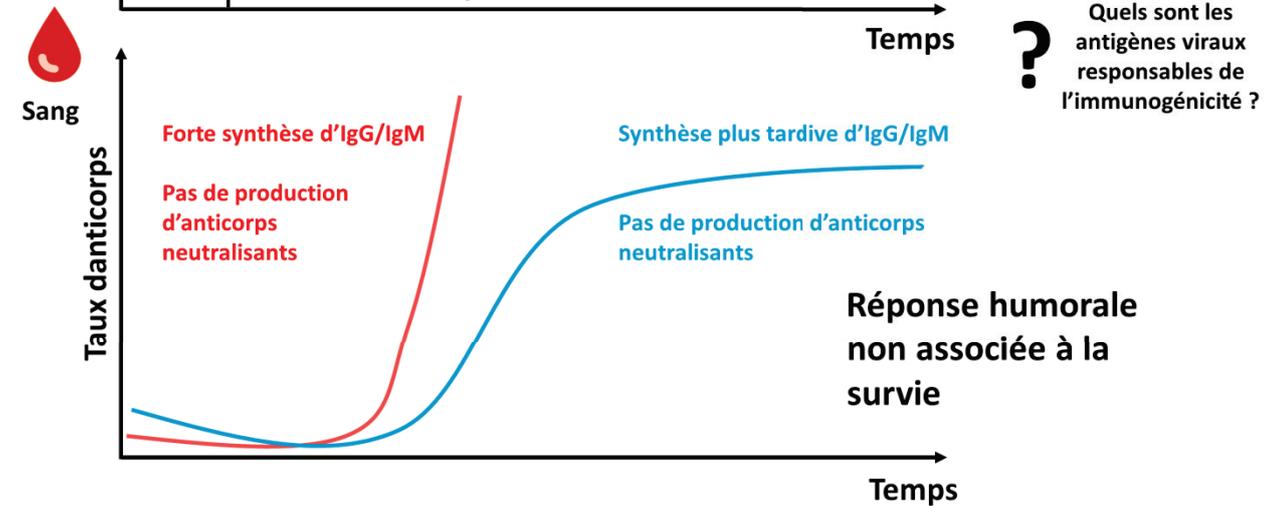
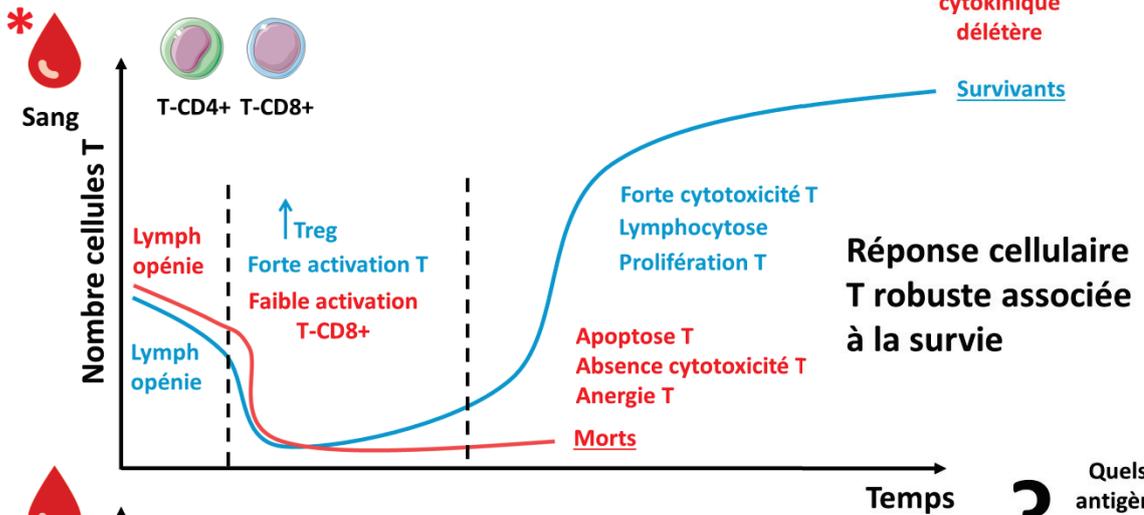
↓ Contrôle

Immunité innée

Cellules présentatrices d'antigènes



Immunité adaptative



V. Analyses transcriptomiques

Nous avons procédé à une analyse transcriptomique des PBMC des animaux infectés afin d'explorer le profil d'expression génique en fonction du temps et en fonction de la sévérité de la maladie. Des études transcriptomiques réalisées dans des PBMC humains infectés par LASV (pendant 4h, 8h et 24h) ont montré que les gènes induits en réponse à l'IFN étaient parmi les transcrits les plus affectés, et dans une moindre mesure les gènes impliqués dans l'apoptose, la voie de signalisation NFκB et la cascade de coagulation ^[346]. Parmi les gènes stimulés en réponse à l'IFN figuraient IFI6, IFI35, IFITM1, IRF7 et SP110 ainsi que certains gènes codant pour des chimiokines, notamment CXCL10, CCL7, CCL8 et MRC1. Ces résultats sont en accord avec une étude transcriptomique réalisée en parallèle dans les PBMC de singes cynomolgus infectés par voie aérosol avec du LASV, où il a été observé une forte induction de gènes de réponse à l'IFN et aux voies de signalisation TLR à des temps précoces après l'infection ^[205]. Les résultats obtenus dans notre modèle sont cohérents avec ces deux études, soulignant ainsi sa pertinence. Dans notre étude, de nombreux gènes stimulés en réponse à l'IFN, notamment MX1, IFIT3, HERC5, RSAD2, ISG15, SIGLEC1, IFI6, IFI44L, OAS1 et IFI27 ont été surexprimés chez les animaux infectés, et en particulier chez les animaux morts de la maladie. Cette réponse robuste a été observée avant l'apparition de la virémie et a été maintenue tout au long de la maladie, en particulier chez les animaux moribonds. Les différences d'expression génique dès J2 post infection ont concerné les gènes CXCL10, CCL8, CCL2, IL27, SERPING1, surexprimés au cours de l'issue fatale et tous impliqués dans l'inflammation et la migration de cellules immunitaires. Nous suggérons donc que la réponse immunitaire innée est davantage stimulée dès J2 post infection chez les animaux infectés par une dose létale du LASV, en raison peut être d'une réplication virale plus importante dans la peau chez ces animaux. De manière intéressante, cette forte surexpression des ISG à J2 post infection signifie que de l'IFN a déjà été produit antérieurement dans les tissus infectés. Nous avons vu que seule la peau présentait une charge virale infectieuse chez les animaux infectés, suggérant que l'infection locale dans la peau a suffi à la production d'IFN-I (indélectable par ELISA) et à entrainer une réponse antivirale globale dans les PBMC. Les étapes très précoces après l'infection, notamment la mise en place de l'immunité innée, semblent donc cruciales pour l'évolution vers l'une ou l'autre des issues de la FL.

C'est au pic de la maladie que nous avons observé la plus grande différence dans le profil d'expression génique chez les animaux morts de la maladie, avec une surexpression impor-

tante des gènes de réponse à l'IFN-I, des chimiokines, des gènes impliqués dans la réponse contre l'infection par un pathogène (HP, BPI, PGLYRP1, MARCO, S100A9, S100A8, MNP1A, CLU), dans la réponse des neutrophiles (TCN1, PRTN3, LTF), dans l'inflammation (CCL23, CCL2, NLRC4, SERPINB5) et dans l'hémostase (TIMP3, MMP8, MMP9, ENG). Cette surexpression coïncide avec le pic de la virémie et peut être la conséquence d'une répllication virale non contrôlée. Cette surexpression maintenue des ISG, des chimiokines inflammatoires, et des gènes impliqués dans l'hémostase pourrait participer au dérèglement de la réponse immunitaire, à son inefficacité au cours des formes fatales de FL et à la cascade physiopathogénique conduisant au choc terminal, à la défaillance multiviscérale et à la mort.

Les études des réponses transcriptionnelles réalisées au cours de la FL, y compris la nôtre, sont différentes de celles observées au cours de l'infection par le virus Ebola ^[347,348]. Au cours des infections par les virus Ebola ou LASV, il a été observé une forte induction des gènes stimulés en réponse à l'IFN, mais la réponse à l'infection par LASV est plus précoce par rapport à l'infection des PNH par le virus Ebola. De plus, au cours de l'infection par LASV, les PBMC n'expriment pas un nombre important de gènes impliqués dans l'apoptose ou de facteurs de coagulation par rapport à ce qui a été observé au cours de l'infection par le virus Ebola, suggérant des différences importantes dans le profil d'expression génique entre différentes FHV.

Outre l'identification des voies cellulaires impliquées dans la pathogenèse ou dans le contrôle de l'infection, l'objectif de l'étude transcriptomique des PBMC était également de faire ressortir des marqueurs précoces d'infection et prédictifs de la maladie. Au cours des 4 premiers jours d'infection, nous avons ainsi identifié comme étant spécifique de l'issue non fatale la surexpression de 4 gènes : GZMA, MELK, VASH2 et AXL. Le gène AXL code pour un récepteur à tyrosine kinase identifié également comme un récepteur d'entrée secondaire du LASV indépendant de l' α -DG ^[140,349]. L'engagement d'AXL par des virus enveloppés régule de manière négative les voies aboutissant à la synthèse d'IFN-I et permet donc d'augmenter la répllication virale ^[253]. Il est cependant difficile de relier l'inhibition de la réponse IFN-I avec la survie des macaques pendant l'infection par LASV. GZMA code pour la protéine cytolytique granzyme A, responsable de la cytotoxicité des lymphocytes T-CD8⁺ et des cellules NK, suggérant qu'une activité cytolytique précoce (probablement orchestrée par les cellules NK) pourrait être impliquée dans le contrôle précoce de l'infection et dans la survie ^[350]. VASH2 code pour la protéine vasohibine 2, impliquée dans la régulation négative de l'angiogénèse ^[350], suggérant un contrôle précoce de la formation de l'endothélium au cours

des formes non sévères de FL. Enfin, MELK code pour une serine/threonine kinase impliquée dans le cycle cellulaire et il a été montré qu'une drogue inhibitrice de MELK parvenait à bloquer la réplication du cytomégalovirus humain ^[350].

Nous avons par ailleurs identifié comme spécifique de l'issue fatale, au cours des 4 premiers jours d'infection, la surexpression de 4 gènes : MYH14, TFPI2, SPP1 et SNED1. MYH14 a déjà été évoqué comme étant impliqué dans des pathologies héréditaires menant à la surdité ^[325]. TFPI2 code pour un régulateur important de la voie extrinsèque de coagulation, via l'inhibition des facteurs Xa et VIIa, coïncidant avec la perturbation des paramètres de coagulation observés chez les animaux moribonds ^[350]. SPP1 code pour l'ostéopontine (ou Eta-1), une phosphoprotéine produite par les cellules immunitaires, épithéliales et les ostéoblastes jouant un rôle dans la réparation tissulaire, l'inflammation et la tumorigenèse ^[351]. De manière intéressante, deux formes d'ostéopontine ont été identifiées : la forme sécrétée, impliquée dans l'induction d'une réponse Th1 et Th17 pathogénique et une forme intracellulaire, régulant les voies de signalisations du TLR-9 et du TLR-7 dans les cellules dendritiques ^[352]. De plus, cette protéine est également impliquée dans la production d'IL-12 et d'IFN- γ ^[353]. Il est donc possible que la surexpression de SPP1 soit impliquée dans la forte réaction inflammatoire ainsi que dans la réponse immunitaire T délétère observée au cours de l'issue fatale. Enfin, SNED1 code pour une glycoprotéine impliquée dans des processus de cancérisation et dont le rôle physiologique n'a pas encore été identifié ^[354].

Ces signatures géniques associées à la survie ou à la mort des primates apparaissent dans les 4 premiers jours après l'infection, avant même l'apparition de la virémie, et peuvent donc servir au développement d'un outil de diagnostic présymptomatique précoce de la FL. Un schéma récapitulatif de la comparaison d'expression des gènes dans les PBMC en fonction de l'issue de la maladie est présenté en **figure 65**.

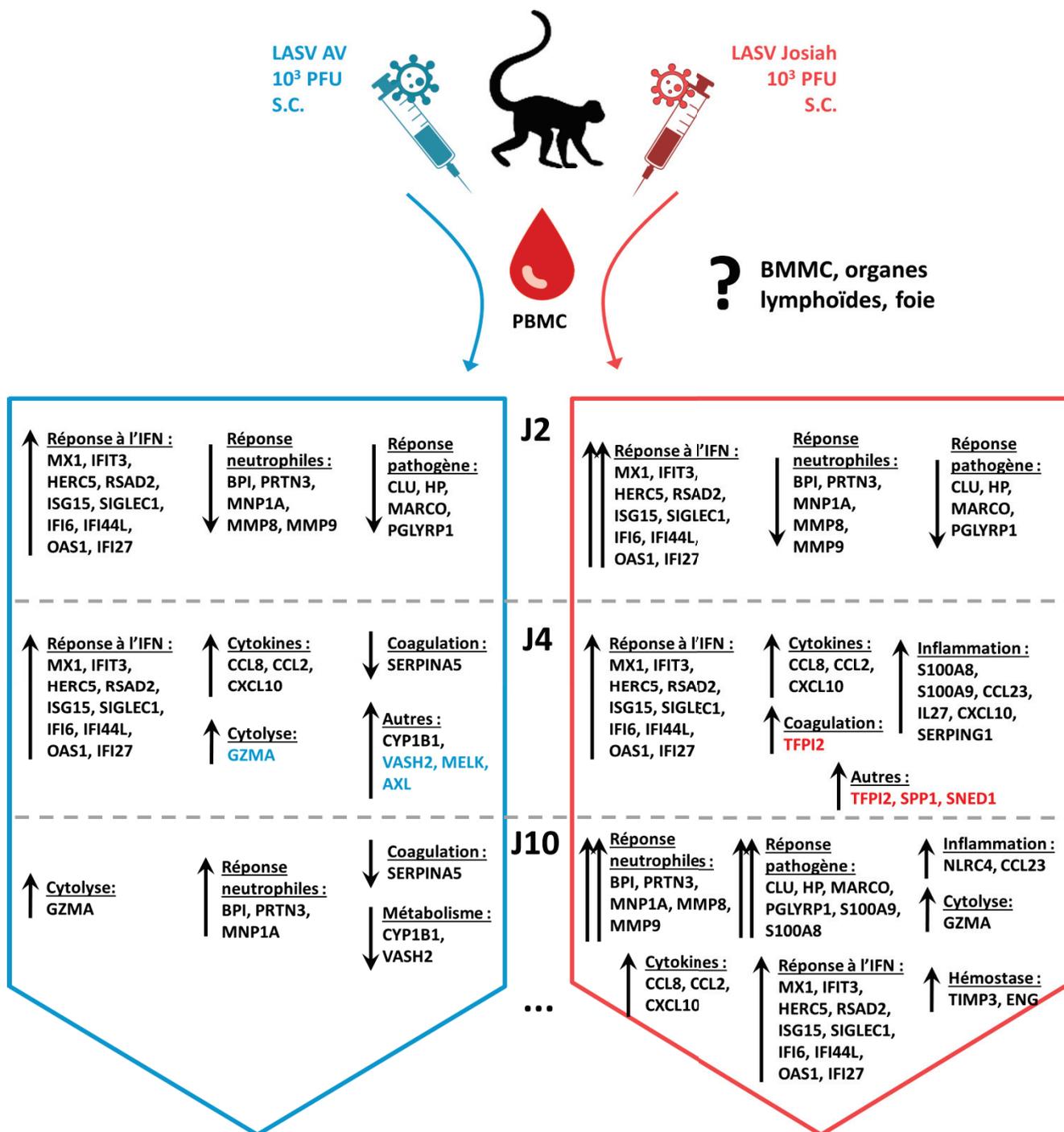


Figure 65 : Comparaison du profil transcriptomique des PBMC en fonction de l'issue de la maladie. Les principales différences d'expression de gènes dans les PBMC ont été répertoriées ici au cours du déroulement de la maladie. Les gènes écrits en bleu correspondent à une surexpression retrouvée uniquement chez les animaux survivants. Les gènes marqués en rouge correspondent à une surexpression de gènes spécifique de l'issue fatale.

Conclusions & Perspectives

La fièvre de Lassa touche plus de 300 000 personnes et est responsable de milliers de morts en Afrique de l'Ouest, sans qu'il n'existe un traitement véritablement efficace. La difficulté d'accès aux cas humains, le manque de modèles rongeurs et la nécessité de travailler en laboratoire de confinement de niveau 4 entravent les recherches sur ce problème de santé publique. Par conséquent, les mécanismes pathogéniques, la physiopathogénèse et les réponses immunitaires ne sont pas entièrement connus, notamment les mécanismes impliqués dans la survie et ceux associés à la mort des patients. Nous avons développé ici un modèle primate dans lequel la totalité des animaux infectés par la souche LASV-AV ont survécu et la totalité des animaux infectés par la souche LASV-Josiah ont succombé à l'infection, nous permettant ainsi une analyse comparative de la physiopathogénèse entre les formes fatales et non fatales de la maladie. L'infection de cohortes d'animaux par les deux souches virales et leur euthanasie programmée à J2, J5 et J11 post infection a rendu possible pour la première fois l'étude des mécanismes pathogéniques dans les organes au cours de la progression de la maladie (**Figure 62**).

Ce modèle est caractérisé par une grande variation au niveau des signes cliniques. Dépression, asthénie, anorexie et prostration ont été les principaux symptômes observés chez les animaux survivants tandis que ces mêmes signes étaient plus sévères chez les animaux fatalement infectés, avec la survenue de fièvre, de pétéchies, de détresse respiratoire, et parfois d'épistaxis. Alors que l'hypoalbuminémie a été commune aux formes fatales et non fatales de la maladie, les atteintes rénales, l'hyponatrémie, l'hypokaliémie, l'hypocalcémie et une rhabdomyolyse ont été observées uniquement au cours des formes fatales et peuvent constituer des marqueurs prédictifs de mortalité de la FL. Bien que des dommages tissulaires et hépatiques aient été identifiés chez les animaux survivants, ceux-ci sont minimes et transitoires par rapport à ceux observés chez les animaux moribonds. L'hémostase est différenciellement affectée en fonction des animaux. En effet, une thrombocytopénie modérée et l'absence de CIVD ont été observées chez tous les animaux mais la perturbation de la voie intrinsèque de la cascade de coagulation a été spécifique de l'issue fatale. L'évolution de la dynamique virale varie fortement entre les formes fatales et non fatales de FL dans notre modèle. En effet, la peau constitue le premier site de réplication virale chez tous les animaux. La dissémination virale a atteint par la suite les organes lymphoïdes, notamment les ganglions, la rate et le thymus chez les ani-

maux survivants. Au pic de la maladie, à J11 post infection, le virus a atteint certains organes systémiques, notamment le foie, les glandes surrénales, les poumons, le tube gastro-intestinal et l'appareil reproducteur, dans lesquels il s'est faiblement répliqué. Aucune particule infectieuse n'a été détectée dans aucun organe au cours de la convalescence des animaux survivants, indiquant un contrôle complet de l'infection. Chez les animaux infectés par une souche létale, la dissémination est nettement plus importante et rapide, avec de fortes charges virales dans les organes lymphoïdes et dans de nombreux organes systémiques dès J5 post infection. Au cours des phases qui précèdent la mort des animaux, tous les organes détiennent une forte charge virale, indiquant une corrélation positive entre la charge virale et la quantité d'organes infectés avec la sévérité de la maladie. La même corrélation a été faite dans le sang et la moelle osseuse, où la virémie est plus précoce et augmente de manière plus importante chez les animaux morts de la maladie tandis que celle-ci est plus tardive, plus faible et contrôlée 3 semaines après l'infection. En conséquence de la réplication virale généralisée chez les animaux moribonds, ces derniers ont présenté des modifications anatomopathologiques, principalement inflammatoires, plus nombreuses et plus sévères que les animaux survivants.

Nos données suggèrent un rôle clé des réponses immunitaires dans le contrôle de l'infection. Chez les survivants, une activation forte et précoce des monocytes et des mDC est observée avec une synthèse d'IFN- α , IL-8 et IL-15. L'issue fatale est caractérisée par une augmentation du nombre de mDC circulant, une activation retardée des CPA et un choc cytokinique observé dans les phases terminales. Une lymphopénie des cellules T, B et NK est présente pendant les phases précoces chez tous les animaux infectés tandis qu'une lymphocytose de ces populations apparaît ensuite uniquement chez les survivants. Ces derniers sont caractérisés par l'induction d'une réponse cellulaire T-CD4⁺ et T-CD8⁺ robuste, illustré par la production d'IFN- γ , de sCD137, sCD40-L et de granzyme B. Le répertoire T chez ces animaux est marqué par une activation, une prolifération, l'acquisition de propriétés cytotoxiques et la présence de lymphocytes T régulateurs dans le sang. Au contraire, une réponse immunitaire adaptative défavorable caractérise les animaux morts de la maladie, avec une activation faible des cellules T-CD8⁺, une apoptose et une anergie des lymphocytes T circulants. Un profil similaire de la réponse T a été observé dans la rate et les ganglions, caractérisé par une forte activation, prolifération et cytotoxicité des cellules T au cours de l'issue non fatale. L'issue fatale est quant à elle marquée par une faible activation et une faible prolifération des cellules T et une cytotoxicité quasi nulle dans les ganglions.

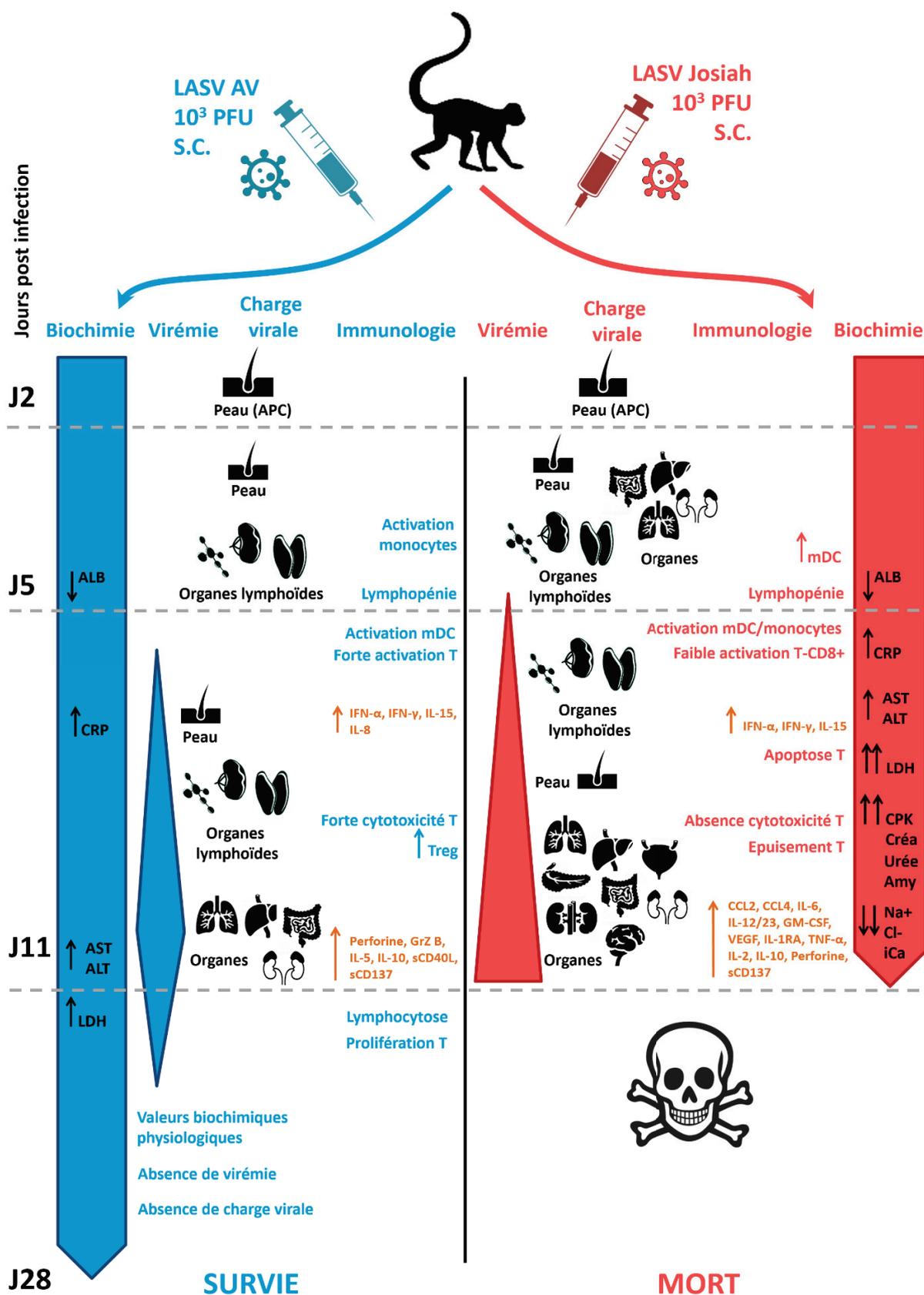


Figure 66 : Hypothèses sur la physiopathogénèse de la FL en fonction de l'issue de la maladie. Les principaux mécanismes biologiques observés au cours de la FL ont été reportés ci-dessus en fonction du temps et en fonction de l'issue de la maladie. L'explication est détaillée dans le corps de la conclusion.

Cette thèse a permis, outre le développement d'un modèle animal pertinent, de mieux comprendre la pathogénèse de la FL tout au long de la maladie et a mis en évidence de nouveaux mécanismes pathogéniques impliqués dans la sévérité de la maladie chez le PNH. De plus, des marqueurs d'infection spécifiques des formes sévères ou non sévères de la FL ont été identifiés et représentent des pistes pour le développement d'outils diagnostics. De nombreuses questions restent cependant en suspens sur ce vaste projet, encore à ses débuts et dont les futures investigations sont à venir.

- Quels sont les effets de l'infection des primates par LASV sur l'hématopoïèse ?

La FL est caractérisée par une altération de la formule sanguine, notamment une lymphopénie et une thrombocytopénie, soulignant une perturbation de l'hématopoïèse. Nous avons, par ailleurs, montré que le LASV se répliquait dans la moelle osseuse, soulignant l'importance de ce compartiment dans la pathogénèse. Des marquages par cytométrie en flux ont été réalisés au cours de l'infection dans la moelle osseuse afin de déterminer le phénotype des différentes populations de progéniteurs hématopoïétiques (cellules souches hématopoïétiques, progéniteurs lymphoïdes et progéniteurs myéloïdes). Nous avons également le transcriptome des cellules mononucléées de moelle osseuse à J2, J4 et J10 post infection au cours des différentes issues de la maladie, permettant l'analyse du profil d'expression génique des progéniteurs hématopoïétiques au cours de l'issue fatale et non fatale. Les résultats sont en cours d'analyse dans notre laboratoire et permettront pour la première fois de déterminer précisément les changements induits dans la moelle osseuse au cours de la FL, le tropisme du virus pour ces progéniteurs et le rôle du virus dans l'altération de l'hématopoïèse.

- Comment évoluent les populations virales au cours de l'infection ?

Les virus à ARN sont connus pour générer à chaque cycle de réplication des populations virales présentant une variabilité génétique. Ces quasi-espèces peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse et dans le fitness viral. En effet, les mutations générées au cours des différents cycles de réplication peuvent être neutres, délétères ou bien bénéfiques en fonction du temps et du compartiment où la réplication a lieu. Le rôle crucial des quasi-espèces dans la dynamique virale et dans la pathogénèse a été montré au cours de l'infection de plusieurs virus, notamment le virus de la polio, le virus de l'hépatite C et le virus ourlien. L'analyse par séquençage haut débit des populations virales en fonction du temps et en fonction de l'organe permettrait ainsi de déterminer si les quasi-espèces sont impliquées dans le tropisme viral et, *in fine*, dans la sévérité de la maladie. La comparaison entre issue fatale et non fatale des po-

pulations virales présentes au niveau du site d'inoculation, dans le sang au long de la virémie, dans les organes lymphoïdes et dans les organes cibles secondaires (organes systémiques) permettrait d'évaluer l'implication des quasi-espèces dans l'évolution vers une forme fatale ou non fatale de la maladie.

- Quelles sont les premières cellules cibles *in vivo* dans la peau ?

Nous avons montré pour la première fois que la peau au niveau du site d'injection constituait le premier site de réplication virale, dès J2 post infection. Nous avons émis l'hypothèse qu'il s'agissait des CPA résidentes dans les tissus. Le rôle de ces cellules est donc crucial et détermine l'évolution de la maladie vers une forme sévère ou non. Afin de confirmer cette hypothèse, il est primordial de pouvoir identifier spécifiquement quel phénotype de cellule est infecté par LASV. Seules des approches histologiques pourront répondre à cette question et des essais sont en cours afin de pouvoir marquer spécifiquement les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques avec le LASV. L'activation des cellules sera évaluée dans la peau au cours des différentes issues afin de déterminer les événements pathogéniques qui ont lieu au cours de cette période clé et qui peuvent être impliquée, dès cette étape, dans le contrôle de l'infection ou dans la mise en place d'une réponse immunitaire délétère.

- Comment évoluent les réponses immunitaires dans les organes au cours de l'infection par LASV ?

En raison de l'ampleur de ce projet, nous n'avons malheureusement pas pu étudier en détail les événements pathogéniques par immunohistochimie. Nous avons montré que les monocytes pouvaient être infectés mais pas les lymphocytes, à proximité des foyers de cellules infectées. Nous avons en notre possession tous les organes des 28 animaux en bloc de paraffine. Nous projetons de déterminer le tropisme du LASV (DC, monocytes, progéniteurs hématopoïétiques, cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules de Kupffer, hépatocytes, cellules microgliales, neurones...) et sa réplication dans les différents tissus. Nous nous focaliserons également sur les tissus lymphoïdes afin de corrélérer les modifications anatomopathologiques observés dans les organes et le tropisme viral. Des marquages viraux corrélés aux marquages de phénotype (cellules T, B, NK, macrophages, DC...) seront effectués pour identifier les cellules cibles. Il sera également intéressant de marquer la prolifération cellulaire (Ki-67), l'apoptose (marquage TUNEL) et la cytotoxicité (granzyme B) afin d'identifier les cellules développant ces phénomènes dans les tissus lymphoïdes. Cette étude, réalisée en fonction du temps et en fonction de la sévérité de la maladie, n'a jamais été effectuée pour la FL et per-

mettra de déterminer le rôle de LASV et de la réponse immunitaire dans la physiopathogénèse. Ces travaux permettront de mettre en évidence des mécanismes impliqués dans la défaillance multiviscérale et le choc terminal, toujours incompris aujourd’hui.

- **Quelle est la réponse transcriptomique des organes clés infectés par LASV ?**

Nous avons commencé la caractérisation du transcriptome des PBMC chez les animaux infectés et mis en évidence des voies de signalisation impliquées dans la pathogénèse ainsi que certains gènes pouvant représenter des marqueurs spécifiques de la gravité de la maladie. Le sang représente un compartiment transitoire, où les cellules immunitaires migrent en direction du lieu d’infection. Il est donc important de dresser le profil d’expression génique dans les organes clés au cours de l’infection, notamment la rate, les ganglions et le foie. L’analyse du transcriptome dans ces organes à J2, J5 et J11 post infection au cours des deux issues de la maladie est en cours d’analyse auprès de nos collaborateurs à l’institut Pasteur, et permettra de mettre en évidence, pour la première fois, la signature génique associée à la survie ou à la mort de la FL dans les organes clés de l’infection. Cela pourrait également ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- **Quelles sont les protéines virales responsables de la mise en place de la réponse immunitaire ?**

Une réponse immunitaire adaptative cellulaire robuste est nécessaire au contrôle de l’infection par LASV alors qu’une immunosuppression est observée au cours des formes fatales. Le rôle de la réponse humorale est, quant à elle, discutable. Il est donc crucial d’identifier quels antigènes viraux sont responsables de la stimulation de cette réponse immunitaire. Pour ce faire, il sera possible de stimuler *ex vivo* les PBMC, les cellules de ganglions ou encore les splénocytes (congelés au fur et à mesure des expérimentations animales) avec des pools de peptides antiviraux spécifiques de LASV-AV et LASV-Josiah, et d’analyser par cytométrie en flux la réactivation des populations de cellules immunitaires. Cette approche intéressante, pourrait mettre en évidence des stratégies vaccinales contre la FL.

Matériel & Méthodes

I. Expérimentations animales

I.1.a. Cellules et Virus

L'unique lignée cellulaire utilisée au cours de cette étude est la lignée VeroE6. Ce sont des cellules épithéliales de rein de singe vert. Elles ont servi à la production des stocks viraux et au titrage de particules infectieuses contenu dans les stocks viraux ainsi que dans les fluides et les organes des animaux infectés. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, Life Technologies) et supplémenté par 0,5% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine).

La souche AV du LASV (GenBank FR832711.1 et FR832710.1) provient initialement du sérum d'un patient atteint d'une FL fatale au cours d'un voyage au Ghana, Côte d'Ivoire et Burkina Faso ^[46]. La souche Josiah du LASV (GenBank HQ688674.1 et HQ688672.1) a été isolée au cours d'une épidémie en Sierra Leone. Les deux souches nous ont été données par Stephan Becker (Institut de Virologie, Université de Marburg, Allemagne). Les souches AV et Josiah ont respectivement subies 4 et 5 passages en cellules VeroE6 à 37°C, 5% CO₂. Chacune des deux souches a été testée pour s'assurer qu'elle ne contenait pas de mycoplasmes.

Pour la préparation des stocks viraux, les deux virus ont été amplifiés dans des VeroE6 infectées pendant 1h à une MOI (*multiplicity of infection*) de 0.01. Les cellules ont ensuite été rincées au PBS puis cultivées en DMEM supplémenté de 2% de SVF et 0.5% d'antibiotiques pendant 3 jours à 37°C, 5% CO₂. Le surnageant des cultures a ensuite été récolté, centrifugé puis congelé à -80°C. La titration du stock a été faite sur VeroE6 (C.f section III du Matériel & Méthodes). Les titres du LASV AV et LASV Josiah sont respectivement calculés à $3,25 \cdot 10^6$ et $1,1 \cdot 10^8$ PFU/mL.

Toutes les expériences avec les différentes souches du virus LASV ont été réalisées dans le laboratoire P4 Jean Mérieux (INSERM, Lyon).

I.1.b. Animaux

En raison du nombre limité de cages dans l'animalerie A4, l'étude présentée ici a nécessité un total de 3 expérimentations sur primates. Ces dernières ont toutes été validées au préalable par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale (CECCAPP, UMS3444/US8, Lyon, France) sous le numéro de dossier 2015062410456662. 28 singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) en bonne santé ont été commandés auprès du centre de primatologie Silabe (Simian Laboratory Europe, Niederhausbergen). Les animaux proviennent de fermes d'élevage situées sur l'île Maurice et ont été testés exempts de tuberculose et entérobactéries pathogènes. Parmi les animaux, 12 étaient des femelles et 16 étaient des mâles. A la suite de leur arrivée au laboratoire, les animaux sont restés une semaine en acclimatation.

I.1.c. Infections

Préalablement à chaque infection, les animaux ont été anesthésiés au Zolétil 100 par voie intramusculaire et ont été tondu à la cuisse au niveau du site d'injection. Tous les animaux ont ensuite été challengés par voie sous-cutanée au niveau de la cuisse droite (quadriceps) par 500 μ L contenant environ 1000 FFU (Focus Forming Unit) du LASV-AV ou du LASV-Josiah. Les inoculums viraux ont été dilués dans du PBS à partir des virus stocks. Trois singes contrôles ont reçu une injection de PBS et ont été utilisés comme témoins négatifs au cours de l'étude. Tous les volumes administrés étaient de 0.5 mL. Chaque inoculum a été titré sur VeroE6 (C.f section III du Matériel & Méthodes pour le protocole) avant et après l'inoculation aux animaux pour s'assurer que la quantité de virus inoculée n'a pas varié pendant le temps nécessaire à l'infection de plusieurs animaux. Les titres des inocula étaient compris entre 2000 FFU et 6000 FFU/mL.

II. Suivi des animaux : analyses cliniques, hématologiques, biologiques et prélèvements biologiques

Les animaux ont été hébergés dans des cages individuelles dont la température, la lumière et l'humidité sont régulées. Les animaux ont été surveillés quotidiennement au cours des différentes expérimentations, comprenant la prise d'alimentation et d'eau, la température, le poids, l'état général et les signes cliniques. Ces observations journalières ont été retranscrites dans une table de scoring adaptée au modèle animal et validée par le comité d'éthique (C.f. ci-

dessous). Un animal a été euthanasié si son score total était supérieur ou égal à 15 et/ou s'il ne présentait pas de signes de réveil après 150 minutes d'anesthésie et/ou si sa température corporelle était inférieure ou égale à 35,3°C.

Date :						Day post infection : Dx					
Group	ID	Temperature			Weight loss (g)			Food			
		Day T°C	ΔΔIT° (C°)	Score Opt : Δ ≤ ±1 1pt : 1 <ΔIT° ≤ 1,7 2pts : 1,7 <ΔIT° ≤ 2,2; 3pts : ΔT° > ±2,2	Day Weight (kg)	Δ weight (%)	Score Opt : ΔW <5,4% 1pt : 5,4% < ΔW ≤ 7,5% 2pts : 7,5% < ΔW ≤ 10% 5pts : ΔW > 10%	Remaining food*	Score Opt : RF ≤ 35% 1pt : 35% < RF ≤ 80% 2pts : RF > 80% percentage of mean of consumption on D-2 to D1	Remaining enrichment	Score Opt : 0 or 1/3 1pt : 2 or 3/3
Water		Dehydration	Bleeding	Petechiae		Respiration	Stool	RESPONSIVENESS		Total score	
Remaining water		Score Opt : RW ≥ 30% 1pt : RW < 30% 2pts : RW = 100% percentage of mean of consumption on D-2 to D1	Score Opt : NTR 1pt : Dehydrated	Score 0 pt : NTR 1 pt : Anal, buccal 2pts : Epistaxis	Petechiae % of body	Score 0 pt : NTR 1 pt : from 1% to 19% 2 pts : from 20% to 50% 3 pts : > 50%	Score 0 pt : NTR 3 pts : Dyspnea 5 pts : severe dyspnea	Score Opt : NTR 1pt : Loose stools 2pts : Diarrhea 5pts : Mucous and fibrinous diarrhea	Score Opt : Normal activity 2pts : Decreased activity, less interaction with its environment 4pts : The animal is sitting slightly but continuously interact with its environment 10pts : The animal is prostrate and no longer interacts with its environment 15pts : moribund	RED if the animal is euthanized total score > 15	

Table de scoring des PNH infectés par le LASV

II.1.a. Autopsie des animaux et prélèvements des organes

Les animaux moribonds ou les animaux destinés à une euthanasie programmée ont été préalablement anesthésiés puis mis à mort par une injection de 5mL de Doléthol par voie intracardiacque en deux temps. Une autopsie complète a été réalisée sur ces animaux ainsi qu'une extraction de fluides et d'organes, notamment sang, plasma, liquide céphalorachidien (LCR), urine, ganglion inguinal et mésentérique, rate, foie, thymus, cerveau, cervelet, gros intestin, intestin grêle, glandes surrénales, pancréas, poumons, ovaires/testicules, rein, vessie, peau au niveau du site d'injection, peau au niveau de la cuisse gauche et cœur. Les organes ont suivi les traitements suivant :

- Prélèvement d'un morceau de ces organes et préservation dans du formol pendant 2 semaines avant un changement de bain pour de l'éthanol 70% : études histologiques (C.f. section I.5).
- Prélèvement d'un morceau de ces organes dans du RNAlater (1018087, Qiagen). Les prélèvements ont été en contact avec le RNAlater pendant environ 12h avant que la solution

soit retirée et que les tubes contenant les différents organes soient placés à -80°C : étude de la charge virale (ARN) (C.f. section I.3.b)

- Prélèvement d'un morceau de ces organes sans traitement (organe dit sec) et congélation des tubes à -80°C : étude de la charge virale (titrage) (C.f. section I.3.a)
- Prélèvement des ganglions mésentériques et inguinaux ainsi qu'un morceau de la rate pour broyage le jour de l'autopsie. Les organes ont été broyés dans du milieu de culture (RPMI 5% SVF supplémenté 1% HEPES et 0,5% antibiotiques) à l'aide d'une seringue dans une boîte de Pétri afin d'en extraire les cellules. La suspension a ensuite été filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire 70µm (15-1070, Biologix). Après centrifugation et retrait du milieu, les globules rouges présents dans le culot cellulaire ont été lysés avec du tampon ACK (A10492-01, Gibco, Life Technologies) pendant 8 minutes. Les cellules ont ensuite été centrifugées et reprises dans du milieu de culture. Une fraction de ces cellules a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Une autre fraction a été lysée pour extraire les ARN (RNeasy mini-kit, Qiagen), selon le protocole du fabricant, pour l'analyse du transcriptome (C.f. section I.6). Une dernière fraction a été mise dans du milieu de congélation (SVF, 10% DMSO) et placée à l'azote pour une utilisation ultérieure.

II.1.b. Suivi des animaux - prélèvements de sang total

Au cours de l'expérimentation, les animaux ont subi des prélèvements de sang tous les jours entre J0 et J4 post infection, tous les deux jours entre J4 et J12 post infection, tous les trois jours entre J12 et J24 et un dernier prélèvement à la fin de l'étude, J28 post infection. Les différents tubes de sang prélevés ont été utilisés pour :

- l'analyse par cytométrie en flux (C.f. I.4.c).
- l'analyse de paramètres de coagulation (le temps de céphaline activé (APTT), le temps de prothrombine (PT), le temps de thrombine (TT), les D-dimères, et le taux de fibrinogène) via l'automate Helena C series et selon les kits et protocoles du fournisseur (Helena Biosciences, Gateshead, Royaume Uni).
- l'analyse des concentrations des ions sodium (Na⁺), potassium (K⁺), chlorure (Cl⁻), le glucose (Glu), la créatinine (Crea), le calcium ionisé (ica), le taux de CO₂ (TCO₂), l'hématocrite (Hct), le trou anionique (AnGap), l'Hémoglobine (Hb) et l'Urée, mesurée par l'automate i-STAT (Abbott, Princeton, Etats Unis) via les cassettes i-STAT Chem8+ Cartridges (AB-9P3125, Abbott).

- l'analyse des taux d'ALT, AST, amylase, créatine phosphokinase (CPK), protéine C réactive (CRP), bilirubine totale (T-BIL), bilirubine directe (D-BIL), gamma-GT (GGT), lactate déshydrogénase (LDH), albumine, protéines totales, calcium, fer et acide urique via l'automate Horiba Pentra C200 et les kits associés selon le protocole du fournisseur (Horiba, Kyoto, Japon).
- L'analyse de la numération sanguine, notamment les globules blancs (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles) globules rouges, hématocrite, hémoglobine, plaquettes, teneur et concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH et CCMH) et volume globulaire moyen (VGM), via l'automate MS9 (Melet Schloesing Laboratories, Osny, France).

Le sang a également été centrifugé à 3500 rpm pendant 5 minutes afin de récolter le plasma. Ce dernier a ensuite été aliquoté et conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure.

Enfin, une partie du sang et de la moelle osseuse prélevés ont servi à l'isolation des PBMC et des cellules mononucléées de la moelle osseuse (BMMC). Brièvement, le sang et la moelle osseuse ont été dilués au demi dans une solution de RPMI 0,5% antibiotiques. Le volume a été déposé à la surface d'un milieu de séparation des lymphocytes dilué à 90% en PBS (MSL, CMSMSL01-01, Eurobio, Les Ulis, France). Les tubes ont ensuite été centrifugés 40 min à 400g à température ambiante avant la récupération des anneaux de PBMC ou BMMC dans du milieu de culture. Après centrifugation des PBMC ou BMMC 10 min à 1300 rpm, les globules rouges contenus dans le culot cellulaire ont été lysés par l'ajout de tampon ACK pendant 8 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés et le culot, débarrassé des globules rouges, a été repris dans 5mL de milieu de culture. Une fraction des cellules a été reprise dans du milieu de congélation avant d'être placée à l'azote liquide. Une autre fraction a directement été lysée pour l'extraction des ARN (RNeasy mini kit, Qiagen) et l'envoi au séquençage pour l'étude transcriptomique.

II.1.c. Suivi des animaux - prélèvement de la moelle osseuse

La moelle osseuse des animaux a été prélevée à J2, J4, J7 et J10 post infection ainsi qu'à l'autopsie des animaux. Les prélèvements ont été effectués au niveau des crêtes iliaques et au niveau des humérus, en prenant soin de ne jamais prélever deux fois au même endroit au cours du suivi d'un même animal. Les prélèvements de moelle osseuse de 3mL ont été effectués à l'aide d'une seringue préalablement remplie avec 300µL de citrate (solution ACD).

Chaque ponction de moelle osseuse a été précédée et suivie d'une injection de Buprénorphine (analgésique) à 17µg/kg par voie intramusculaire. Les prélèvements de moelle osseuse ont été utilisés pour :

- l'analyse par cytométrie en flux (C.f. I.4.c).
- l'isolation des BMMC pour congélation en azote liquide
- l'isolation des BMMC pour l'extraction d'ARN et l'envoi au séquençage pour l'étude transcriptomique.
- la récupération du plasma de moelle osseuse et sa congélation à -80°C pour une utilisation ultérieure.

III. Analyse de la virémie

III.1.a. Analyse de la quantité de génome par RT-qPCR

Fluides. L'ARN viral contenu dans les échantillons de plasma, de LCR et d'urine provenant des animaux infectés ont été extraits en utilisant le kit QIAamp (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. La PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec le kit Eurobiogreen Lo-ROX qPCR mix (Eurobio, Les Ulis, France) en utilisant les amorces suivantes : 5'-CTTTCCCCTGGCGTGTC A-3' et 5'-GAATTTTGAAGGCTGCCTTGA-3' ciblant la NP du virus LASV Josiah ; 5'-CTCTCACCCGGAGTATCT-3' et 5'-CCTCAATCAATGGATGGC-3' ciblant la NP du virus LASV AV. La lecture et l'amplification s'est faite via l'automate Light Cycler 480 II (Roche, Boulogne-Billancourt, France).

Organes. Les organes traités en RNAlater et stockés à -80°C ont été coupés, pesés et broyés à l'aide de billes stériles calibrées et de l'automate Tissue Lyser II (Qiagen). Les ARN ont ensuite été extraits des broyats organiques via le kit RNeasy (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Une fois la RTqPCR effectuée, la quantité de génome viral a été rapportée par mg d'organe.

III.1.b. Analyse de la quantité de particules infectieuses par titrage

Le surnageant issu des organes secs broyés ainsi que les fluides des animaux infectés ont été titrés sur cellules VeroE6. Brièvement, les cellules VeroE6 ont été infectées par des dilutions sériées des surnageants de tissus ou des fluides provenant des animaux et ont été incubées à 37°C 5% CO₂ après ajout de carboxy-methyl-cellulose (2%) dilué au demi dans du DMEM

5% SVF 0.5% antibiotiques. Les foyers infectieux ont été détectés suite à l'incubation d'un cocktail d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines virales (L52-54-6A, L53-237-5, et YQB06-AE05, donnés par le Dr. P. Jahrling (USAMRIID, Fort Detrick, Etats Unis) suivi par l'incubation d'anticorps secondaires couplés HRP et reconnaissant les IgG murins (Sigma, France).

IV. Analyse des réponses immunitaires

IV.1.a. Technologie Luminex

Deux kits multiplex PNH ont été utilisés pour le criblage des cytokines/ chimiokines, notamment PRCYTMAG40K-PX24-25 et PCYTMG-40K-PX23 (Merck, Etats Unis). Ces kits ont permis l'analyse simultanée de cytokines et chimiokines multiples par l'utilisation de billes magnétiques sur lesquelles sont couplées des complexes d'anticorps spécifiques d'un analyte. Pas moins de 37 cytokines ont ainsi été criblées dans le plasma des animaux au cours du temps : GM-CSF, G-CSF, TGF α , IFN γ , IL-1ra, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL12/23, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-23, IL-28a, sCD40L, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP1, TNF α , TNF β , VEGF, FGF2, Eotaxin, CX3CL1, sCD137, Granzyme A et B, CXCL10, sFASL et Perforin. Les tests ont été effectués dans le laboratoire P4 via le système MAGPIX (Merck) selon les instructions du fournisseur.

IV.1.b. ELISA pour IFN α

La présence d'IFN- α dans le plasma des animaux a été analysée avec un kit ELISA humain (BMS216, ThermoFisher) selon le protocole du fabricant. Les plasmas ont été dilués au 1/5^e et les tests ont été réalisés dans le laboratoire P4. La révélation a été effectuée sur le lecteur de plaque Multiskan Ascent 96/384 (MTX Lab Systems).

IV.1.c. ELISA pour IgM/IgG

Afin de détecter les IgG spécifiques du LASV par ELISA, des plaques Polysorp (055137, Dutscher) ont été incubées sur la nuit à 4°C avec des antigènes (LASV Josiah, 17.45) ou des antigènes négatifs dilués au 1:1000^e en PBS. Après 3 lavages en PBS 0.5% Tween, les plaques ont été saturées par une solution de PBS-BSA 2.5% pendant 1h à 37°C. Les plasmas dilués au 1:250^e, 1:1000^e, 1:4000^e, 1:16000^e en PBS 0.5% Tween 2.5% BSA ont ensuite été

déposés sur les plaques avant incubation 1h à l'étuve. Après 3 lavages en PBS 0.5% Tween, un anticorps anti-singe couplé peroxydase (SAB3700766, Sigma) a été appliqué. Après 3 lavages, les plaques ont été incubées avec du TMB (50-76-00, Eurobio) jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue suffisante. La réaction a ensuite été stoppée par ajout d'une solution de H₃PO₄. La densité optique de la coloration a ensuite été mesurée via le lecteur de plaques TECAN Infinite M200.

Afin de détecter les IgM spécifiques du LASV par ELISA, des plaques Maxisorp (055303, Dutscher) ont été incubées sur la nuit à 4°C avec des anticorps anti- μ de singe (SAB3700778, Sigma) à une concentration de 5 μ g/mL. Après 3 lavages en PBS 0.5% Tween, les plaques ont été saturées pendant 2h à l'étuve avec une solution de PBS-BSA 2.5%. Les plasmas dilués au 1:100^e, 1:400^e et au 1:1600^e en PBS 0.5% Tween 2.5% BSA ont ensuite été déposés sur les plaques avant incubation 1h à l'étuve. Après 3 lavages, les antigènes LASV (17.47) ou les antigènes négatifs dilués au 1:5^e en PBS 2.5% BSA 0.5% Tween ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant 1h à 37°C. Après 3 lavages, les anticorps monoclonaux (clones 1/7/10 dilués au 1:1000^e) ont été mis en contact avec les plaques pendant 1h à 37°C. Après 3 lavages, l'anticorps anti-souris couplé peroxydase (A0168, Sigma), dilué au 1:2500^e a été mis en contact pendant 1h avec les plaques avant d'effectuer à nouveau 3 lavages et d'ajouter le TMB jusqu'à l'apparition d'une coloration bleue suffisante. La réaction a ensuite été stoppée par ajout d'une solution de H₃PO₄. La densité optique de la coloration a ensuite été mesurée via le lecteur de plaques TECAN Infinite M200.

IV.1.d. Cytométrie en flux

Sang total. Les analyses par cytométrie ont été effectuées de manière cinétique via le sang total des animaux prélevés dans des tubes EDTA. Plusieurs panels ont été élaborés et sont présentés ci-dessous. Les références des anticorps sont mentionnées en annexe. 50 μ L de sang ont été déposés dans des tubes avant l'ajout des anticorps de surface et l'incubation sur glace pendant 30 min à l'obscurité. Les globules rouges ont ensuite été lysés par le kit Immunoprep (7546999, Beckman Coulter France) selon les instructions du constructeur. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 min à 300g et 800 μ L de surnageant a été retiré avant la resuspension des cellules et leur analyse par cytométrie en flux.

Les marquages intracellulaires ont nécessité des étapes supplémentaires. A la suite de l'incubation des anticorps de surface, les cellules ont été lysées avec le tampon BD Pharmlyse (BD Biosciences France) et incubées 15 min à température ambiante. Après centrifugation,

les cellules ont été lavées avec une solution de lavage (PBS 0.5% SVF, 2mM EDTA). Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 500µL de tampon de fixation/perméabilisation (FoxP3 staining kit, 130-093-142, Miltenyi France) pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. A la suite de ces étapes, les cellules ont été lavées puis incubées dans une solution de perméabilisation (FoxP3 staining kit, Miltenyi France) avant l'ajout d'une solution de blocage (FcR Blocking reagent, 130-059-901, Miltenyi) suivi de l'incubation avec les différents anticorps intracellulaires pendant 30 min à 4°C et à l'abri de la lumière. Enfin, les cellules ont été lavées avec la solution de lavage avant d'être reprises dans 200µL de tampon de fixation (BD Stabilizing Fixative, BD Biosciences) pour leur analyse par FACS.

Les cellules destinées au marquage annexine V / 7-AAD ont été marquées avec les anticorps de surface puis lysées avec le tampon BD Pharmlyse avant d'être resuspendues dans une solution d'annexine V binding Buffer (422201, Ozyme, France). Les cellules ont ensuite été incubées avec l'annexine V et le 7-AAD pendant 15 min à température dans l'obscurité avant d'être analysées par FACS.

Cellules d'organes. Les cellules extraites des organes les jours d'autopsie ont été comptées et un nombre précis a été déposé dans des tubes de cytométrie. Les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires puis ont été lavées avec une solution de lavage avant d'être analysées par FACS. Concernant les marquages intracellulaires, les cellules ont subi le même traitement que pour les marquages intracellulaires sur sang total, mais avec les étapes de lyse en moins. Il en est de même pour les cellules destinées au marquage annexine V / 7-AAD.

La fluorescence des cellules marquées a été mesurée par le cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter). Les tubes de sang total ont reçu 20µL de billes Flowcount (Beckman Coulter) afin de déterminer le nombre absolu de cellules présentes dans les échantillons avant leur analyse. Les données ont ensuite été travaillées en utilisant le logiciel Kaluza (version 1.2, Beckman Coulter).

Panels utilisés au cours de la 1ere expérimentation :

PANEL	1	2intra	3	4	5intra
Fluorochromes	Différenciation NK/B/T	Cytotoxicité des NK-T	Activation Sous-populations T	Activation Sous-populations T bis	Isolation Treg Th17
BV421	CD56 - NCAM16.2	CD56 - NCAM16.2	CD3 - SP34-2	CD3 - SP34-2	CD4 - L200
BV510	CD3 - SP34-2	CD3 - SP34-2			CD3 - SP34-2
FITC	CD45 - D058-1283	Perforin - Pf-344	HLA-DR - G46-6	CD45RO - UCHL1	
PE	CD10 - HI10a	CD10 - HI10a	CD154 - 5C8		CD161 - DX12
PE-CF594				CD28 - CD28.2	
PerCP-Cy5.5			CD152 - CTLA-4	CCR7 - G043H7	IL17a - N49-653
PE-Cy7	CD20 - 2H7	Ki67 - B56	CD69 - FN50	CD45RA - 5H9	CD127 - MB15-18C9
APC	NKp80 - 4A4	CD4 - L200	CD27 - M-T271	CD95 - DX2	FoxP3 - 3G3
Alexa 700	CD4 - L200	GrzB - GB11	CD4 - L200	CD4 - L200	
APC-H7	CD8 - RPA-T8	CD8 - RPA-T8	CD8 - RPA-T8	CD8 - RPA-T8	CD25 - M-A251
PANEL	6	7 Anx/AAD	8	9	10
Fluorochromes	Activation/Mémoire B	Apoptose des Mono/NK/T	Différenciation DC/Mono/Macro	Activation DC/Mono	Différenciation Précurseurs Hématopoïétiques
BV421	CD86 - FM95	CD4 - L200	CD45 - D058-1283	CD86 - FM95	CD34 - 581
BV510	CD80 - L307	CD3 - SP34-2		CD80 - L307	CD61 - VI-PL2
FITC	CD279 - EH12.2H7		CD1c - AD5-8E7	CD1c - AD5-8E7	CD38 - AT-1
PE	CD40 - 5C3	AnnexinV	CD66abce - TET2	CD40 - 5C3	CD150 - A12
PE-CF594					
PerCP-Cy5.5		7AAD	CD83 - HB15e	CD69 - FN50	
PE-Cy7	CD20 - 2H7		HLA-DR - G46-6	HLA-DR - G46-6	CD123 - 7G3
APC	CD27 - M-T271	NKp80 - 4A4	CD303 - BDCA2	CD303 - BDCA2	CD42b - HIP1
Alexa 700		CD14 - M5E2	CD14 - M5E2	CD14 - M5E2	
APC-H7	CD3 - SP34-2	CD20 - 2H7	CD16 - 3G8	HLA-ABC - W6/32	CD41 - HIP8

Panels utilisés au cours des expérimentations 2 et 3 :

PANEL	1	2intra	3	4	5intra
Fluorochromes	Différenciation NK/B/T	Cytotoxicité des NK-T	Activation Sous-populations T	Activation Sous-populations T bis	Isolation Treg Th17
BV421	CD56 - B159	CD45 - D058-1283	CD3 - SP34-2	CD3 - SP34-2	CD4 - L200
BV510	CD3 - SP34-2	CD3 - SP34-2	CD45 - D058-1283	CD45 - D058-1283	CD3 - SP34-2
FITC	CD45 - D058-1283	Perforin - Pf-344	HLA-DR - REA293	CD27 - M-T271	
PE	CD10 - HI10a	CD56 - B159	CD154 - 5C8		CD161 - DX12
PE-CF594			CD279 - EH12.2H7	CD28 - CD28.2	
PerCP-Cy5.5	CD16 - REA423	CD16 - REA423	CD69 - FN50	CCR7 - G043H7	IL17a - N49-653
PE-Cy7	CD20 - 2H7	Ki67 - B56	CD137 - 4B4-1	CD45RA - 5H9	CD127 - MB15-18C9
APC	NKp80 - 4A4	CD4 - L200		CD95 - DX2	FoxP3 - 3G3
Alexa 700	CD4 - L200	GrzB - GB11	CD4 - L200	CD4 - L200	
APC-H7	CD8 - SK1	CD8 - SK1	CD8 - SK1	CD8 - SK1	CD25 - M-A251

PANEL	6	7 Anx/AAD	8	9	10
Fluorochromes	Activation/Mémoire B	Apoptose des Monos/B/NK/T	Différenciation DC/Mono/Macro	Activation DC/Mono	Différenciation Précurseurs Hématopoïétiques
BV421	CD86 - FM95	CD3 - SP34-2	CD16 - REA423	CD86 - FM95	CD33 - AC104.3E3
BV510	CD80 - L307	CD14 - TÜK4	CD11c - S-HCL-3	CD80 - L307	CD90 - 5E10
FITC	CD279 - EH12.2H7		CD1c - AD5-8E7	CD1c - AD5-8E7	CD38 - AT-1
PE	CD40 - 5C3	AnnexinV	CD141 - 1A4	CD40 - 5C3	
PE-CF594	CD45 - D058-1283		CD279 - EH12.2H7	CD83 - HB15e	CD34 - 563
PerCP-Cy5.5		7AAD	CD123 - 7G3	CD69 - FN50	CD135 - BV10A4H2
PE-Cy7	CD20 - 2H7	CD20 - 2H7	CD303 - AC144	CD303 - AC144	CD45RA - 5H9
APC	CD27 - M-T271	CD4 - L200	CD14 - TÜK4	CD14 - TÜK4	LIN*
Alexa 700			CD45 - D058-1283	HLA-ABC - W6/32	CD41 - HIP8
APC-H7	CD3 - SP34-2	CD8 - SK1	HLA-DR - AC122	HLA-DR - AC122	CD49F - GoH3

PANEL 11	
Fluorochromes	Populations Hématopoïétiques
BV421	CD56 - B159
BV510	CD3 - SP34-2
FITC	CD45 - D058-1283
PE	CD10 - HI10a
PE-CF594	CD14 - M5E2
PerCP-Cy5.5	CD16 - REA423
PE-Cy7	CD20 - 2H7
APC	NKp80 - 4A4
Alexa 700	CD4 - L200
APC-H7	CD8 - SK1

*LIN (APC)	
CD2 - RPA-2.10	CD20 - 2H7
CD3 - SP34-2	CD56 - B159
CD16 - REA423	CD8 - RPA-T8

V. Histologie

Les morceaux d'organes des animaux infectés ont été fixés pendant 2 semaines dans une solution de formaline 10%. Les organes ont ensuite été déshydratés par bains successifs d'alcool à concentration croissante avant d'être plongés dans du xylène (Sigma) et inclus dans la paraffine liquide Surgipath Paraplast (Leica, France), le tout effectué par le carrousel STP120 (Microm Microtech, Brignais, France). Les organes ont été montés en blocs de paraffine via la station d'enrobage TES99 (Tech-Inter, Thoiry, France). Les blocs ont été coupés par section d'une épaisseur comprise entre 3 et 5 μm via le microtome RM2125 RTS (Leica). Les coupes ont ensuite été montées soit sur lames Superfrost (Thermo) pour la coloration hématoxyline-éosine, soit sur les lames Superfrost + (VWR) pour les immunomarquages.

Colorations hématoxyline-éosine. Les lames ont été plongées dans un bain de xylène puis d'alcool pur puis ont été rincées à l'eau claire avant d'être mises en contact pendant 2 minutes avec l'hématoxyline (Leica). Les lames ont ensuite été rincées et baignées dans une solution de carbonate de lithium saturée avant d'être mises en contact pendant 2 minutes avec l'éosine (Leica). Les lames ont ensuite été rincées avant d'être baignées dans de l'alcool pur puis du xylène. Enfin, les coupes ont été montées entre lame et lamelles via le liquide de montage Eukitt (Sigma). Enfin, les lames ont été observées sous un microscope à lumière blanche. Les analyses ont été effectuées par Grégory Jouvion de l'unité Histopathologie Humaine et Modèles Animaux de l'institut Pasteur.

Immunomarquages. Les coupes ont été séchées puis déparaffinées par deux bains de xylène suivi de deux bains d'alcool pur. Les coupes ont ensuite été démasquées dans du tampon citrate pH6 1X chauffé à 90°C pendant 30 min via le 2100 Retriever (Aptum, Royaume Uni). Les lames ont ensuite été lavées à l'eau distillée, puis saturées avec une solution de sérum albumine bovine 3% pendant 20 minutes dans une chambre humide. Concernant les simples marquages (détection du virus), la solution d'anticorps primaire, composé d'un anticorps anti GP2c-LASV (L52-272-7) dilué au 1:50^e dans une solution de PBS-BSA 3%, a été appliquée sur les coupes pendant la nuit à 4°C dans une chambre humide. Après 3 lavages des lames en PBS, les peroxydases endogènes ont été inhibées par incubation des coupes pendant 20 min dans une solution contenant 0.3% de H₂O₂. Après une nouvelle étape de lavages, les lames ont été incubées pendant 30 min avec une solution d'anticorps secondaires couplés peroxydase prêt à l'emploi (N-Histofine, Microm-Microtech, France). Les coupes ont ensuite été

rincées au PBS avant leur incubation en présence d'un chromogène rouge permanent (F/960D-10, Cell Marque, France). L'incubation a été arrêtée lorsque le marquage rouge était suffisamment visible. Enfin les lames ont été lavées, contre colorées pendant 5 secondes dans l'hématoxyline, rincées, montées entre lames et lamelles avec le milieu ImmuMount (Thermo) puis observée via le microscope Leica DMI8 et le logiciel LASX. Concernant les doubles marquages immunofluorescents, les coupes ont été incubées avec une solution de PBS-BSA 3% contenant un anticorps anti GP2c-LASV souris dilué au 1:50^e et un anti CD68 lapin (clone KP1) (Abcam) ou un anti CD3 lapin (Dako), dilué tous les deux au 1/50^e. Les lames ont ensuite été incubées avec la solution d'anticorps secondaires : anti-souris Alexa 555 et anti-lapin Alexa 488 (Thermo) dilués au 1:1000^e dans une solution de PBS BSA 3%. Après trois lavages à l'eau distillée, les coupes ont été montées entre lames et lamelles avec le milieu ProLong Gold DAPI (Thermo) et observées sur un microscope confocal Leica SP5 (PLATIM, ENS, Lyon). Toutes les images ont ensuite été traitées avec le logiciel Image J.

VI. Transcriptomique

Les PBMC de 3 animaux infectés par LASV-AV et 3 animaux infectés par LASV-Josiah ont été récupérés à J2, J4 et J10 post infection. Ces mêmes cellules ont également été récupérées à J28 post infection chez 3 animaux contrôles. Les ARN de ces cellules ont été extraits en utilisant les kits RNeasy mini kit et RNase free DNase set (Qiagen), suivie par une seconde digestion de l'ADN (Turbo DNA free kit, Ambion, Life Technologies). Le séquençage du transcriptome a été réalisé par Virosan3D (Lyon, France). Les quantités et la qualité des ARN ont été mesurées par le système RNA Quantifluor (Promega, France). Les cDNA ont été synthétisés par amorçage aléatoire des ARN polyadénylés. Le séquençage des bibliothèques d'ADNc a été réalisé par lecture unique de fragments d'une taille de 75 nucléotides avec un minimum de 57.10^6 lectures par échantillon via la technologie Illumina, NextSeq 500 et les kits NEXTflex Rapid Illumina Directional RNA-Seq Library Prep Kit (Boo Scientific). L'analyse bioinformatique a été réalisée en utilisant le pipeline RNA-seq Sequana par Rachel Legendre, ingénieure de recherche au Hub de Bioinformatique et Biostatistique du C3BI (Institut Pasteur, Paris, France). Les séquences des adaptateurs et les lectures de basses qualités ont été éliminées en utilisant cutadapt version 1.11. Seules les lectures de plus de 25 nucléotides ont été gardées pour la suite de l'analyse. STAR version 2.5.0a, avec les paramètres par défaut, a été utilisé pour aligner les lectures contre le génome de référence (*Macaca mulata*, Ensembl ver-

sion 90). featureCounts version 1.4.6-p3 a été utilisé pour compter les lectures assignées sur les gènes du Macaque (paramètres : -t gene -g ID -O -s 2). Les analyses statistiques ont été opérées par Emeline Perthame, ingénieure de recherche au Hub de Bioinformatique et Biostatistique du C3BI (Institut Pasteur, Paris, France). Le logiciel R a été utilisé pour les analyses statistiques. Le comptage des lectures a été normalisé par la méthode de normalisation implémentée dans le package DESeq2. Ce package propose aussi un modèle de régression négative binomiale, choisi pour l'analyse différentielle. Le package gage a été utilisé pour l'analyse fonctionnelle, sur la base de données de voies biologiques KEGG. La redondance au sein des ensembles de gènes sets a été allégée à l'aide de la fonction esset.grp() du même package. Tous les tests statistiques ont été réalisés au seuil 5% et les *p-values* corrigées par la méthode de Benjamini-Hochberg [BH].

VII. Analyses statistiques

Pour chaque test statistique appliqué, le test de normalité Shapiro-Wilk a été effectué sur le jeu de données. A la suite de ce résultat, un test de comparaison de moyennes non paramétrique (Mann Whitney) ou paramétrique (Student *t*-test) a été appliqué. * : $p\text{-value} < 0.05$; ** : $p\text{-value} < 0.01$; *** : $p\text{-value} < 0.001$; **** : $p\text{-value} < 0.0001$. Le logiciel utilisé est GraphPad Prism (v7.04).

Références

1. Fields, B. N., Knipe, D. M. (David M. & Howley, P. M. *Fields virology*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007).
2. Fagherazzi-Pagel, H. Maladies émergentes et réémergentes chez l'homme : concepts, facteurs d'émergence, alertes, riposte et coopération mondiale.
3. Bi, Z., Formenty, P. B. H. & Roth, C. E. Hantavirus infection: a review and global update. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2**, 3–23 (2008).
4. Krautkrämer, E., Zeier, M. & Plyusnin, A. Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney Int.* **83**, 23–27 (2013).
5. Hoogstraal, H. Review Article 1: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa. *J. Med. Entomol.* **15**, 307–417 (1979).
6. Ergönül, Ö. Crimean-Congo haemorrhagic fever. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 203–214 (2006).
7. Nicolas, G., Durand, B., Duboz, R., Rakotondraivo, R. & Chevalier, V. Description and analysis of the cattle trade network in the Madagascar highlands: Potential role in the diffusion of Rift Valley fever virus. *Acta Trop.* **126**, 19–27 (2013).
8. Park, S.-W. *et al.* Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, South Korea, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1880–1882 (2014).
9. Kouri, G. P., Guzmán, M. G., Bravo, J. R. & Triana, C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull. World Health Organ.* **67**, 375–80 (1989).
10. Barrett, A. D. T. & Higgs, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu. Rev. Entomol.* **52**, 209–29 (2007).
11. Mehla, R. *et al.* Recent Ancestry of Kyasanur Forest Disease Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1431–1437 (2009).
12. Alzahrani, A. G. *et al.* Alkhurma Hemorrhagic Fever in Humans, Najran, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1882–1888 (2010).
13. Palanisamy, N., Akaberi, D., Lennerstrand, J. & Lundkvist, Å. Comparative genome analysis of Alkhurma hemorrhagic fever virus with Kyasanur forest disease and tick-borne encephalitis viruses by the *in silico* approach. *Pathog. Glob. Health* **112**, 210–226 (2018).
14. Simipson1, D. I. H. Fievres hemorrhagiques virales de l'homme*. *J. Infect. Dis.* **122**, 437–453 (1970).
15. Ebola data and statistics. *WHO*
16. Cross, R. W., Mire, C. E., Feldmann, H. & Geisbert, T. W. Post-exposure treatments for Ebola and Marburg virus infections. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17**, 413–434 (2018).
17. Miraglia, C. M. Marburgviruses: An Update. *Lab. Med.* (2018). doi:10.1093/labmed/lmy046
18. Hassanin, A. *et al.* Comparative phylogeography of African fruit bats (Chiroptera, Pteropodidae) provide new insights into the outbreak of Ebola virus disease in West Africa, 2014–2016. *C. R. Biol.* **339**, 517–528 (2016).
19. Zapata, J. C., Cox, D. & Salvato, M. S. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. doi:10.1371/journal.pntd.0002858
20. Moran, G. J., Talan, D. A. & Abrahamian, F. M. Biological terrorism. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, 145–87, vii (2008).
21. Radoshitzky, S. R. *et al.* Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* **160**, 1851–74 (2015).
22. Damonte, E. B. & Coto, C. E. Treatment of arenavirus infections: from basic studies to the challenge of antiviral therapy. *Adv. Virus Res.* **58**, 125–55 (2002).
23. Fultz, P. N., Shaddock, J. A., Kang, C. Y. & Streilein, J. W. Mediators of protection against lethal systemic vesicular stomatitis virus infection in hamsters: defective interfering particles, polyinosinate-polycytidylate, and interferon. *Infect. Immun.* **37**, 679–86 (1982).
24. Barton, L. L. & Hyndman, N. J. Lymphocytic choriomeningitis virus: reemerging central nervous system pathogen. *Pediatrics* **105**, E35 (2000).
25. Rowe, W. P. *et al.* Arenaviruses: proposed name for a newly defined virus group. *J. Virol.* **5**, 651–2 (1970).
26. Li, K. *et al.* Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China. *Virology* **476**, 37–42 (2015).

27. Blasdel, K. R. *et al.* Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia. *Elife* **5**, (2016).
28. Briese, T. *et al.* Genetic Detection and Characterization of Lujo Virus, a New Hemorrhagic Fever–Associated Arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathog.* **5**, e1000455 (2009).
29. Charrel, R. N. *et al.* Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1118–1124 (2002).
30. Delgado, S. *et al.* Chapare Virus, a Newly Discovered Arenavirus Isolated from a Fatal Hemorrhagic Fever Case in Bolivia. *PLoS Pathog.* **4**, e1000047 (2008).
31. Golden, J. W. *et al.* An attenuated Machupo virus with a disrupted L-segment intergenic region protects guinea pigs against lethal Guaranito virus infection. *Sci. Rep.* **7**, 4679 (2017).
32. Arribalzaga, R. A. New epidemic disease due to unidentified germ: nephrotoxic, leukopenic and enanthematous hyperthermia. *Dia Med.* **27**, 1204–10 (1955).
33. Tesh, R. B., Jahrling, P. B., Salas, R. & Shope, R. E. Description of Guaranito virus (Arenaviridae: Arenavirus), the etiologic agent of Venezuelan hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**, 452–9 (1994).
34. Gonzalez, J. P. J., Bowen, M. D., Nichol, S. T. & Rico-Hesse, R. Genetic Characterization and Phylogeny of Sabiá Virus, an Emergent Pathogen in Brazil. *Virology* **221**, 318–324 (1996).
35. Fulhorst, C. F. *et al.* Isolation and Characterization of Whitewater Arroyo Virus, a Novel North American Arenavirus. *Virology* **224**, 114–120 (1996).
36. Fehling, S. K., Lennartz, F. & Strecker, T. Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. *Viruses* **4**, 2973–3011 (2012).
37. Frame, J. D., Baldwin, J. M., Gocke, D. J. & Troup, J. M. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. I. Clinical description and pathological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 670–6 (1970).
38. Buckley, S. M. & Casals, J. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 680–91 (1970).
39. Monath, T. P. Lassa fever: review of epidemiology and epizootiology.
40. Monath, T. P., Maher, M., Casals, J., Kissling, R. E. & Cacciapuoti, A. Lassa fever in the Eastern Province of Sierra Leone, 1970–1972. II. Clinical observations and virological studies on selected hospital cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**, 1140–9 (1974).
41. Lukashevich, I. S., Clegg, J. C. & Sidibe, K. Lassa virus activity in Guinea: distribution of human antiviral antibody defined using enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant antigen. *J. Med. Virol.* **40**, 210–7 (1993).
42. Frame, J. D., Yalley-Ogunro, J. E. & Hanson, A. P. Endemic Lassa fever in Liberia. V. Distribution of Lassa virus activity in Liberia: hospital staff surveys. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 761–3 (1984).
43. White, H. A. Lassa fever. A study of 23 hospital cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**, 390–401 (1972).
44. Macher, A. M. & Wolfe, M. S. Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 835–7 (2006).
45. Atkin, S. *et al.* The first case of Lassa fever imported from Mali to the United Kingdom, February 2009. *Euro Surveill.* **14**, (2009).
46. Gunther, S. *et al.* Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterization of a New Lassa Virus Strain. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 466–476 (2000).
47. Georges, A. J. *et al.* Antibodies to Lassa and Lassa-like viruses in man and mammals in the Central African Republic. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 78–9 (1985).
48. for Disease Control Centres pour le contrôle, C. *et al.* Fièvre de Lassa.
49. Richmond, J. K. & Baglolle, D. J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ* **327**, 1271–5 (2003).
50. Fichet-Calvet, E. & Rogers, D. J. Risk maps of Lassa fever in West Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e388 (2009).
51. McCormick, J. B. *et al.* A Prospective Study of the Epidemiology and Ecology of Lassa Fever carried out primarily in the eastern province of Sierra. **155**, 437–444 (1987).
52. Tomori, O., Fabiyi, A., Sorungbe, A., Smith, A. & McCormick, J. B. Viral hemorrhagic fever antibodies in Nigerian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**, 407–10 (1988).
53. Yun, N. E. & Walker, D. H. Pathogenesis of lassa fever. *Viruses* **4**, 2031–2048 (2012).
54. Gibb, R., Moses, L. M., Redding, D. W. & Jones, K. E. Understanding the cryptic nature of Lassa fever in West Africa. *Pathog. Glob. Health* **111**, 276–288 (2017).

55. Beeching, N. J., Fletcher, T. E., Hill, D. R. & Thomson, G. L. Travellers and viral haemorrhagic fevers: What are the risks? *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**, S26–S35 (2010).
56. Safronetz, D. *et al.* Detection of Lassa virus, Mali. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1123–6 (2010).
57. OMS | Fièvre de Lassa – Allemagne. *WHO* (2016).
58. Olayemi, A. *et al.* New Hosts of The Lassa Virus. *Sci. Rep.* **6**, 25280 (2016).
59. Isaäcson, M. The ecology of *Praomys* (*Mastomys*) *natalensis* in southern Africa. *Bull. World Health Organ.* **52**, 629–36 (1975).
60. Redding, D. W., Moses, L. M., Cunningham, A. A., Wood, J. & Jones, K. E. Environmental-mechanistic modelling of the impact of global change on human zoonotic disease emergence: a case study of Lassa fever. *Methods Ecol. Evol.* **7**, 646–655 (2016).
61. Garba, M. *et al.* Spatial segregation between invasive and native commensal rodents in an urban environment: a case study in Niamey, Niger. *PLoS One* **9**, e110666 (2014).
62. Borremans, B. *et al.* Shedding dynamics of Morogoro virus, an African arenavirus closely related to Lassa virus, in its natural reservoir host *Mastomys natalensis*. *Sci. Rep.* **5**, 10445 (2015).
63. Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Koivogui, L., Daffis, S. & ter Meulen, J. Reproductive characteristics of *Mastomys natalensis* and Lassa virus prevalence in Guinea, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **8**, 41–8 (2008).
64. Fichet-Calvet, E. *et al.* Fluctuation of abundance and Lassa virus prevalence in *Mastomys natalensis* in Guinea, West Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 119–28 (2007).
65. Lalis, A. *et al.* The impact of human conflict on the genetics of *Mastomys natalensis* and Lassa virus in West Africa. *PLoS One* **7**, e37068 (2012).
66. Makundi, R. H., Massawe, A. W. & Mulungu, L. S. Reproduction and population dynamics of *Mastomys natalensis* Smith, 1834 in an agricultural landscape in the Western Usambara Mountains, Tanzania. *Integr. Zool.* **2**, 233–238 (2007).
67. Walker, D. H., Wulff, H., Lange, J. V & Murphy, F. A. Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea-pigs, and *Mastomys natalensis*. *Bull. World Health Organ.* **52**, 523–34 (1975).
68. Stephenson, E. H., Larson, E. W. & Dominik, J. W. Effect of environmental factors on aerosol-induced Lassa virus infection. *J. Med. Virol.* **14**, 295–303 (1984).
69. Ter Meulen, J. *et al.* Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 661–6 (1996).
70. Bonner, P. C. *et al.* Poor housing quality increases risk of rodent infestation and Lassa fever in refugee camps of Sierra Leone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 169–75 (2007).
71. Monath, T. P. *et al.* A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March–April 1972. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **22**, 773–9 (1973).
72. Lo Iacono, G. *et al.* Using modelling to disentangle the relative contributions of zoonotic and anthroponotic transmission: the case of lassa fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e3398 (2015).
73. Colangelo, P. *et al.* A mitochondrial phylogeographic scenario for the most widespread African rodent, *Mastomys natalensis*. *Biol. J. Linn. Soc.* **108**, 901–916 (2013).
74. Gryseels, S. *et al.* When Viruses Don't Go Viral: The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses. *PLoS Pathog.* **13**, e1006073 (2017).
75. Whitmer, S. L. M. *et al.* New Lineage of Lassa Virus, Togo, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 599–602 (2018).
76. Jahrling, P. B., Frame, J. D., Rhoderick, J. B. & Monson, M. H. Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 380–4 (1985).
77. Bowen, M. D. *et al.* Genetic diversity among Lassa virus strains. *J. Virol.* **74**, 6992–7004 (2000).
78. Günther, S. *et al.* Lassa Fever Encephalopathy: Lassa Virus in Cerebrospinal Fluid but Not in Serum. *J. Infect. Dis.* **184**, 345–349 (2001).
79. Murphy, F. A. & Whitfield, S. G. Morphology and morphogenesis of arenaviruses*.
80. Leung, W. C. & Rawls, W. E. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* **81**, 174–6 (1977).
81. Agnihothram, S. S. *et al.* Assembly of arenavirus envelope glycoprotein GPC in detergent-soluble membrane microdomains. *J. Virol.* **83**, 9890–900 (2009).
82. Lukashevich, I. S., Stelmakh, T. A., Golubev, V. P., Stchesljenok, E. P. & Lemeshko, N. N. Ribonucleic acids of Machupo and Lassa viruses. *Arch. Virol.* **79**, 189–203 (1984).
83. Meyer, B. J. & Southern, P. J. Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic

- RNAs. *J. Virol.* **68**, 7659–64 (1994).
84. Perez, M. & de la Torre, J. C. Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **77**, 1184–94 (2003).
 85. Hass, M. *et al.* Mutational analysis of the lassa virus promoter. *J. Virol.* **80**, 12414–9 (2006).
 86. Meyer, B. J. & Southern, P. J. Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *J. Virol.* **67**, 2621–7 (1993).
 87. Salvato, M. S., Schweighofer, K. J., Burns, J. & Shimomaye, E. M. Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res.* **22**, 185–98 (1992).
 88. Fuller-Pace, F. V & Southern, P. J. Temporal analysis of transcription and replication during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **162**, 260–3 (1988).
 89. Brunotte, L. *et al.* Structure of the Lassa virus nucleoprotein revealed by X-ray crystallography, small-angle X-ray scattering, and electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **286**, 38748–56 (2011).
 90. Jiang, X. *et al.* Structures of arenaviral nucleoproteins with triphosphate dsRNA reveal a unique mechanism of immune suppression. *J. Biol. Chem.* **288**, 16949–59 (2013).
 91. Zhang, Y. *et al.* Crystal structure of Junin virus nucleoprotein. *J. Gen. Virol.* **94**, 2175–2183 (2013).
 92. Hastie, K. M. *et al.* Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19365–70 (2011).
 93. Qi, X. *et al.* Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* **468**, 779–783 (2010).
 94. Lelke, M., Brunotte, L., Busch, C. & Günther, S. An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome. *J. Virol.* **84**, 1934–44 (2010).
 95. Eckerle, L. D. *et al.* Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog.* **6**, e1000896 (2010).
 96. Martínez-Sobrido, L. *et al.* Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **83**, 11330–40 (2009).
 97. Martínez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A. & de la Torre, J. C. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J. Virol.* **81**, 12696–703 (2007).
 98. Martínez-Sobrido, L., Zúñiga, E. I., Rosario, D., García-Sastre, A. & de la Torre, J. C. Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **80**, 9192–9 (2006).
 99. 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.* **88**, 13923–7 (2014).
 100. Pythoud, C. *et al.* Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKK ϵ . *J. Virol.* **86**, 7728–38 (2012).
 101. Groseth, A., Wolff, S., Strecker, T., Hoenen, T. & Becker, S. Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *J. Virol.* **84**, 3603–11 (2010).
 102. Casabona, J. C., Levingston Macleod, J. M., Loureiro, M. E., Gomez, G. A. & Lopez, N. The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J. Virol.* **83**, 7029–39 (2009).
 103. Shtanko, O., Watanabe, S., Jasenosky, L. D., Watanabe, T. & Kawaoka, Y. ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *J. Virol.* **85**, 3631–41 (2011).
 104. Vieth, S., Torda, A. E., Asper, M., Schmitz, H. & Günther, S. Sequence analysis of L RNA of Lassa virus. *Virology* **318**, 153–168 (2004).
 105. Krug, R. M. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **93**, 125–49 (1981).
 106. Morin, B. *et al.* The N-Terminal Domain of the Arenavirus L Protein Is an RNA Endonuclease Essential in mRNA Transcription. *PLoS Pathog.* **6**, e1001038 (2010).
 107. Lehmann, M. *et al.* Role of the C terminus of Lassa virus L protein in viral mRNA synthesis. *J. Virol.* **88**, 8713–7 (2014).
 108. Kranzusch, P. J. & Whelan, S. P. J. Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19743–8 (2011).
 109. Wallat, G. D. *et al.* High-Resolution Structure of the N-Terminal Endonuclease Domain of the Lassa Virus L Polymerase in Complex with Magnesium Ions. *PLoS One* **9**, e87577 (2014).

110. Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T. & Garten, W. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS Lett.* **538**, 203–6 (2003).
111. York, J. & Nunberg, J. H. Distinct requirements for signal peptidase processing and function in the stable signal peptide subunit of the Junin virus envelope glycoprotein. *Virology* **359**, 72–81 (2007).
112. Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M. & Dobberstein, B. Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *J. Biol. Chem.* **278**, 41914–20 (2003).
113. Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.-D., Seidah, N. G. & Garten, W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12701–12705 (2001).
114. Wright, K. E., Spiro, R. C., Burns, J. W. & Buchmeier, M. J. Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **177**, 175–83 (1990).
115. Schlie, K., Strecker, T. & Garten, W. Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail. *FEBS Lett.* **584**, 4379–82 (2010).
116. Burns, J. W. & Buchmeier, M. J. Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* **183**, 620–9 (1991).
117. Cao, W. *et al.* Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079–81 (1998).
118. York, J. & Nunberg, J. H. Role of the Stable Signal Peptide of Junin Arenavirus Envelope Glycoprotein in pH-Dependent Membrane Fusion. *J. Virol.* **80**, 7775–7780 (2006).
119. Wang, W., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, S. & Xiao, G. Structure-function relationship of the mammarenavirus envelope glycoprotein. *Virol. Sin.* **31**, 380–394 (2016).
120. Freed, E. O. Viral late domains. *J. Virol.* **76**, 4679–87 (2002).
121. Capul, A. A. *et al.* Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J. Virol.* **81**, 9451–60 (2007).
122. Schlie, K. *et al.* Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J. Virol.* **84**, 3178–88 (2010).
123. Levingston Macleod, J. M. *et al.* Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J. Virol.* **85**, 2012–23 (2011).
124. Ortiz-Riaño, E., Cheng, B. Y. H., de la Torre, J. C. & Martínez-Sobrido, L. The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *J. Virol.* **85**, 13038–48 (2011).
125. Shtanko, O. *et al.* A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J. Virol.* **84**, 5415–22 (2010).
126. Perez, M., Craven, R. C. & de la Torre, J. C. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12978–83 (2003).
127. Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H. & Yasuda, J. Cellular Factors Required for Lassa Virus Budding. *J. Virol.* **80**, 4191–4195 (2006).
128. Borden, K. L., Campbell Dwyer, E. J. & Salvato, M. S. An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J. Virol.* **72**, 758–66 (1998).
129. Hsu, K.-S. & Kao, H.-Y. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci.* **8**, 5 (2018).
130. Asper, M. *et al.* Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus. *J. Virol.* **78**, 3162–9 (2004).
131. Djavani, M. *et al.* Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **75**, 6204–8 (2001).
132. Borden, K. L., Campbelldwyer, E. J., Carlile, G. W., Djavani, M. & Salvato, M. S. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J. Virol.* **72**, 3819–26 (1998).
133. Kentsis, A. *et al.* The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J. Mol. Biol.* **312**, 609–23 (2001).
134. Campbell Dwyer, E. J., Lai, H., MacDonald, R. C., Salvato, M. S. & Borden, K. L. The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J. Virol.* **74**, 3293–300 (2000).
135. Cornu, T. I. & de la Torre, J. C. RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *J. Virol.* **75**, 9415–26 (2001).

136. Jácamo, R., López, N., Wilda, M. & Franze-Fernández, M. T. Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *J. Virol.* **77**, 10383–93 (2003).
137. Fan, L., Briese, T. & Lipkin, W. I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J. Virol.* **84**, 1785–91 (2010).
138. 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.* **89**, 2944–55 (2015).
139. Spiropoulou, C. F., Kunz, S., Rollin, P. E., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. A. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J. Virol.* **76**, 5140–6 (2002).
140. Shimojima, M., Stroher, U., Ebihara, H., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. Identification of Cell Surface Molecules Involved in Dystroglycan-Independent Lassa Virus Cell Entry. *J. Virol.* **86**, 2067–2078 (2012).
141. Goncalves, A.-R. *et al.* Role of DC-SIGN in Lassa Virus Entry into Human Dendritic Cells. *J. Virol.* **87**, 11504–11515 (2013).
142. Sullivan, B. M., Welch, M. J., Lemke, G. & Oldstone, M. B. A. Is the TAM Receptor Axl a Receptor for Lymphocytic Choriomeningitis Virus? *J. Virol.* **87**, 4071–4074 (2013).
143. Radoshitzky, S. R. *et al.* Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* **446**, 92–96 (2007).
144. Jae, L. T. & Brummelkamp, T. R. Emerging intracellular receptors for hemorrhagic fever viruses. *Trends Microbiol.* **23**, 392–400 (2015).
145. Baize, S. *et al.* Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* **172**, 2861–9 (2004).
146. Baize, S. *et al.* Role of interferons in the control of Lassa virus replication in human dendritic cells and macrophages. *Microbes Infect.* **8**, 1194–202 (2006).
147. Bello, V. *et al.* The dystroglycan: Nestled in an adhesome during embryonic development. *Dev. Biol.* **401**, 132–142 (2015).
148. Kunz, S., Campbell, K. P. & Oldstone, M. B. A. Alpha-dystroglycan can mediate arenavirus infection in the absence of beta-dystroglycan. *Virology* **316**, 213–20 (2003).
149. Inamori, K. -i. *et al.* Dystroglycan Function Requires Xylosyl- and Glucuronyltransferase Activities of LARGE. *Science (80-.)*. **335**, 93–96 (2012).
150. Kunz, S. *et al.* Posttranslational Modification of α -Dystroglycan, the Cellular Receptor for Arenaviruses, by the Glycosyltransferase LARGE Is Critical for Virus Binding. *J. Virol.* **79**, 14282–14296 (2005).
151. Goddeeris, M. M. *et al.* LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. *Nature* **503**, 136–140 (2013).
152. Moraz, M.-L. *et al.* Cell entry of Lassa virus induces tyrosine phosphorylation of dystroglycan. *Cell. Microbiol.* **15**, 689–700 (2013).
153. Rojek, J. M., Sanchez, A. B., Nguyen, N. T., de la Torre, J.-C. & Kunz, S. Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *J. Virol.* **82**, 7677–87 (2008).
154. Iwasaki, M., Ngo, N. & de la Torre, J. C. Sodium hydrogen exchangers contribute to arenavirus cell entry. *J. Virol.* **88**, 643–54 (2014).
155. Oppliger, J., Torriani, G., Herrador, A. & Kunz, S. Lassa Virus Cell Entry via Dystroglycan Involves an Unusual Pathway of Macropinocytosis. *J. Virol.* **90**, 6412–6429 (2016).
156. Mercer, J. & Helenius, A. Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 490–499 (2012).
157. Pasqual, G., Rojek, J. M., Masin, M., Chatton, J.-Y. & Kunz, S. Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog.* **7**, e1002232 (2011).
158. Jae, L. T. *et al.* Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science (80-.)*. **344**, 1506–1510 (2014).
159. Nunberg, J. H. & York, J. The curious case of arenavirus entry, and its inhibition. *Viruses* **4**, 83–101 (2012).
160. Burrell, C. J. *et al.* Arenaviruses. *Fenner White's Med. Virol.* 425–436 (2017). doi:10.1016/B978-0-12-375156-0.00030-8
161. Fuller-Pace, F. V & Southern, P. J. Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species. *J. Virol.* **63**, 1938–44 (1989).
162. López, N., Jácamo, R. & Franze-Fernández, M. T. Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J. Virol.* **75**, 12241–51 (2001).
163. Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B. & de La Torre, J. C. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are

- sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J. Virol.* **74**, 3470–7 (2000).
164. Strecker, T. *et al.* The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Viol. J.* **3**, 93 (2006).
165. Eichler, R. *et al.* Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res.* **100**, 249–255 (2004).
166. Bieniasz, P. D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**, 55–63 (2006).
167. Hurley, J. H. ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* **34**, 2398–407 (2015).
168. Sundquist, W. I. *et al.* Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* **13**, 783–9 (2004).
169. Burri, D. J., Palma, J. R., Kunz, S. & Pasquato, A. Envelope Glycoprotein of Arenaviruses. *Viruses* **4**, 2162–2181 (2012).
170. McCormick, J. B. *et al.* A case-control study of the clinical diagnosis and course of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* **155**, 445–55 (1987).
171. Fisher-Hoch, S. P. *et al.* Review of cases of nosocomial Lassa fever in Nigeria: the high price of poor medical practice. *BMJ* **311**, 857–9 (1995).
172. Price, M. E., Fisher-Hoch, S. P., Craven, R. B. & McCormick, J. B. A prospective study of maternal and fetal outcome in acute Lassa fever infection during pregnancy. *BMJ* **297**, 584–7 (1988).
173. Frame, J. D. Clinical features of Lassa fever in Liberia. *Rev. Infect. Dis.* **11 Suppl 4**, S783-9
174. Okokhere, P. *et al.* Clinical and laboratory predictors of Lassa fever outcome in a dedicated treatment facility in Nigeria: a retrospective, observational cohort study. *Lancet. Infect. Dis.* **0**, (2018).
175. Bausch, D. G. *et al.* Lassa Fever in Guinea: I. Epidemiology of Human Disease and Clinical Observations. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **1**, 269–281 (2001).
176. Cummins, D. *et al.* Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* **264**, 2093–6
177. Monson, M. H. *et al.* Pediatric Lassa fever: a review of 33 Liberian cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**, 408–15 (1987).
178. Okogbenin, S. A. *et al.* New lessons from a case series review of Lassa fever in pregnancy. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e380 (2010).
179. Walker, D. H. *et al.* Pathologic and virologic study of fatal Lassa fever in man. *Am. J. Pathol.* **107**, 349–56 (1982).
180. Edington, G. M. & White, H. A. The pathology of lassa fever. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**, 381–389 (1972).
181. Hensley, L. E. *et al.* Pathogenesis of Lassa fever in cynomolgus macaques. *Viol. J.* **8**, 205 (2011).
182. Winn, W. C. & Walker, D. H. The pathology of human Lassa fever. *Bull. World Health Organ.* **52**, 535–45 (1975).
183. McCormick, J. B. *et al.* Lassa virus hepatitis: a study of fatal Lassa fever in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 401–7 (1986).
184. Lukashevich, I. S. Lassa virus lethality for inbred mice. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920).* **65**, 207–9 (1985).
185. Yun, N. E. *et al.* Functional interferon system is required for clearance of lassa virus. *J. Virol.* **86**, 3389–92 (2012).
186. Bradfute, S. B., Stuthman, K. S., Shurtleff, A. C. & Bavari, S. A STAT-1 knockout mouse model for Machupo virus pathogenesis. *Viol. J.* **8**, 300 (2011).
187. Gowen, B. B. *et al.* Development of a new tacaribe arenavirus infection model and its use to explore antiviral activity of a novel aristeromycin analog. *PLoS One* **5**, e12760 (2010).
188. Kolokoltsova, O. A. *et al.* Mice lacking alpha/beta and gamma interferon receptors are susceptible to junin virus infection. *J. Virol.* **84**, 13063–7 (2010).
189. Rieger, T., Merkler, D. & Günther, S. 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**, e72290 (2013).
190. Yun, N. E. *et al.* Mice lacking functional STAT1 are highly susceptible to lethal infection with Lassa virus. *J. Virol.* **87**, 10908–11 (2013).
191. Flatz, L. *et al.* T Cell-Dependence of Lassa Fever Pathogenesis. *PLoS Pathog.* **6**, e1000836 (2010).
192. Webb, P. A., Justines, G. & Johnson, K. M. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull. World Health Organ.* **52**, 493–9 (1975).
193. Hall, W. C., Geisbert, T. W., Huggins, J. W. & Jahrling, P. B. Experimental infection of guinea pigs with Venezuelan hemorrhagic fever virus (Guanarito): a model of human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 81–8 (1996).
194. Jahrling, P. B., Hesse, R. A., Rhoderick, J. B., Elwell, M. A. & Moe, J. B. Pathogenesis of a pichinde virus strain adapted to produce lethal infections in guinea pigs. *Infect. Immun.* **32**, 872–

- 80 (1981).
195. Tauraso, N. & Shelokov, A. Protection against Junin Virus by immunization with live Tacaribe virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **119**, 608–11 (1965).
196. Bird, B. H. *et al.* Severe Hemorrhagic Fever in Strain 13/N Guinea Pigs Infected with Lujo Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1801 (2012).
197. Jahrling, P. B., Smith, S., Hesse, R. A. & Rhoderick, J. B. Pathogenesis of Lassa virus infection in guinea pigs. *Infect. Immun.* **37**, 771–8 (1982).
198. Jahrling, P. B., Frame, J. D., Smith, S. B. & Monson, M. H. Endemic Lassa fever in Liberia. III. Characterization of Lassa virus isolates. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**, 374–9 (1985).
199. Walker, D. H. *et al.* Experimental infection of rhesus monkeys with Lassa virus and a closely related arenavirus, Mozambique virus. *J. Infect. Dis.* **146**, 360–8 (1982).
200. Walker, D. H., Wulff, H. & Murphy, F. A. Experimental Lassa virus infection in the squirrel monkey. *Am. J. Pathol.* **80**, 261–78 (1975).
201. Walker, D. H. & Murphy, F. A. Pathology and pathogenesis of arenavirus infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **133**, 89–113 (1987).
202. Peters, C. J. *et al.* Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **134**, 5–68 (1987).
203. Lange, J. V. *et al.* Kinetic Study of Platelets and Fibrinogen in Lassa Virus-Infected Monkeys and Early Pathologic Events in Mopeia Virus-Infected Monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**, 999–1007 (1985).
204. 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.* **83**, 5890–903 (2009).
205. Malhotra, S. *et al.* Transcriptional profiling of the circulating immune response to lassa virus in an aerosol model of exposure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2171 (2013).
206. Safronetz, D. *et al.* A Recently Isolated Lassa Virus From Mali Demonstrates Atypical Clinical Disease Manifestations and Decreased Virulence in Cynomolgus Macaques. *J. Infect. Dis.* **207**, 1316–1327 (2013).
207. Jahrling, P. B. & Peters, C. J. Passive antibody therapy of Lassa fever in cynomolgus monkeys: importance of neutralizing antibody and Lassa virus strain. *Infect. Immun.* **44**, 528–33 (1984).
208. Callis, R. T., Jahrling, P. B. & DePaoli, A. Pathology of Lassa virus infection in the rhesus monkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 1038–45 (1982).
209. Jahrling, P. B. *et al.* Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *J. Infect. Dis.* **141**, 580–9 (1980).
210. Fisher-Hoch, S. P. *et al.* Physiological and immunologic disturbances associated with shock in a primate model of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* **155**, 465–74 (1987).
211. Fisher-Hoch, S. P., Hutwagner, L., Brown, B. & McCormick, J. B. Effective vaccine for lassa fever. *J. Virol.* **74**, 6777–83 (2000).
212. Geisbert, T. W. *et al.* Development of a New Vaccine for the Prevention of Lassa Fever. *PLoS Med.* **2**, e183 (2005).
213. Carrion, R. *et al.* Lassa virus infection in experimentally infected marmosets: liver pathology and immunophenotypic alterations in target tissues. *J. Virol.* **81**, 6482–90 (2007).
214. Evseev, A. A., Dvoretzkaia, V. I., Bogatnikov, G. V., Pshenichnov, V. A. & Mustafin, R. M. [Experimental Lassa fever in hamadryas baboons]. *Vopr. Virusol.* **36**, 150–2
215. Cashman, K. A. *et al.* Immune-Mediated Systemic Vasculitis as the Proposed Cause of Sudden-Onset Sensorineural Hearing Loss following Lassa Virus Exposure in Cynomolgus Macaques. *MBio* **9**, (2018).
216. Carnec, X. *et al.* A Vaccine Platform against Arenaviruses Based on a Recombinant Hyperattenuated Mopeia Virus Expressing Heterologous Glycoproteins. *J. Virol.* **92**, (2018).
217. Lukashevich, I. S. *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates. *Vaccine* **26**, 5246–5254 (2008).
218. Aronson, J. F., Herzog, N. K. & Jerrells, T. R. Pathological and virological features of arenavirus disease in guinea pigs. Comparison of two Pichinde virus strains. *Am. J. Pathol.* **145**, 228–35 (1994).
219. Scott, E. P. & Aronson, J. F. Cytokine patterns in a comparative model of arenavirus haemorrhagic fever in guinea pigs. *J. Gen. Virol.* **89**, 2569–79 (2008).
220. Connolly, B. M. *et al.* Pathogenesis of Pichinde virus infection in strain 13 guinea pigs: an immunocytochemical, virologic, and clinical chemistry study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**, 10–24 (1993).
221. Lukashevich, I. S. *et al.* LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Arch. Virol.* **149**, 2319–36 (2004).
222. Lukashevich, I. S. *et al.* Arenavirus-mediated liver

- pathology: acute lymphocytic choriomeningitis virus infection of rhesus macaques is characterized by high-level interleukin-6 expression and hepatocyte proliferation. *J. Virol.* **77**, 1727–37 (2003).
223. Johnson, R. F. *et al.* Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. *Virology* **421**, 129–40 (2011).
224. Lukashevich, I. S. The search for animal models for Lassa fever vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 71–86 (2013).
225. Johnson, K. M. *et al.* Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J. Infect. Dis.* **155**, 456–64 (1987).
226. Cummins, D. *et al.* Lassa fever encephalopathy: clinical and laboratory findings. *J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 197–201 (1992).
227. Fisher-Hoch, S., McCormick, J. B., Sasso, D. & Craven, R. B. Hematologic dysfunction in Lassa fever. *J. Med. Virol.* **26**, 127–35 (1988).
228. McCormick, J. B. *et al.* Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* **314**, 20–6 (1986).
229. Schmitz, H. *et al.* Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes Infect.* **4**, 43–50 (2002).
230. McCormick, J. B. & Fisher-Hoch, S. P. Lassa fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**, 75–109 (2002).
231. Cummins, D. *et al.* A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Lassa fever. *Br. J. Haematol.* **72**, 543–8 (1989).
232. Mahanty, S. & Bray, M. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. *Lancet. Infect. Dis.* **4**, 487–98 (2004).
233. Aleksandrowicz, P. *et al.* Viral haemorrhagic fever and vascular alterations. *Hamostaseologie* **28**, 77–84 (2008).
234. Lukashevich, I. S. *et al.* Lassa and Mopeia virus replication in human monocytes/macrophages and in endothelial cells: different effects on IL-8 and TNF-alpha gene expression. *J. Med. Virol.* **59**, 552–60 (1999).
235. Mahanty, S. *et al.* Low Levels of Interleukin- 8 and Interferon-Inducible Protein-10 in Serum Are Associated with Fatal Infections in Acute Lassa Fever. *J. Infect. Dis.* **183**, 1713–1721 (2001).
236. Ciurea, A. *et al.* Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus at very low levels in immune mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11964–9 (1999).
237. McElroy, A. K. *et al.* A Case of Human Lassa Virus Infection With Robust Acute T-Cell Activation and Long-Term Virus-Specific T-Cell Responses. *J. Infect. Dis.* **215**, 1862–1872 (2017).
238. Subissi, L. *et al.* Ebola Virus Transmission Caused by Persistently Infected Survivors of the 2014–2016 Outbreak in West Africa. *J. Infect. Dis.* (2018). doi:10.1093/infdis/jiy280
239. Anderson, J. L. *et al.* Congenital Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *J. Child Neurol.* **29**, 837–842 (2014).
240. Netea, M. G., Quintin, J. & van der Meer, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
241. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–52 (1998).
242. Bowen, M. D., Peters, C. J. & Nichol, S. T. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**, 301–16 (1997).
243. Pannetier, D., Faure, C., Deubel, V. & Baize, S. Human Macrophages , but Not Dendritic Cells , Are Activated and Produce Alpha / Beta Interferons in Response to Mopeia Virus Infection. (2004). doi:10.1128/JVI.78.19.10516
244. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769–79 (2001).
245. Schneider, W. M., Chevillotte, M. D. & Rice, C. M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–45 (2014).
246. Radoshitzky, S. R. *et al.* Infectious Lassa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin. *J. Virol.* **84**, 10569–80 (2010).
247. Prescott, J. B. *et al.* Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 195–207 (2017).
248. Mahanty, S. *et al.* Cutting edge: impairment of dendritic cells and adaptive immunity by Ebola and Lassa viruses. *J. Immunol.* **170**, 2797–801 (2003).
249. Pannetier, D., Reynard, S., Russier, M., Carnec, X. & Baize, S. 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 Negl. Trop. Dis.* **8**, e2637 (2014).
250. Versteeg, G. A. & García-Sastre, A. Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Curr. Opin.*

- Microbiol.* **13**, 508–16 (2010).
251. Rodrigo, W. W. S. I. *et al.* Arenavirus nucleoproteins prevent activation of nuclear factor kappa B. *J. Virol.* **86**, 8185–97 (2012).
 252. Lemke, G. Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a009076–a009076 (2013).
 253. Bhattacharyya, S. *et al.* Enveloped Viruses Disable Innate Immune Responses in Dendritic Cells by Direct Activation of TAM Receptors. *Cell Host Microbe* **14**, 136–147 (2013).
 254. Vivier, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44–9 (2011).
 255. Russier, M., Reynard, S., Tordo, N. & Baize, S. NK cells are strongly activated by Lassa and Mopeia virus-infected human macrophages in vitro but do not mediate virus suppression. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1822–32 (2012).
 256. Biron, C. A., Nguyen, K. B. & Pien, G. C. Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **263**, 7–27 (2002).
 257. Russier, M., Reynard, S., Carnec, X. & Baize, S. The Exonuclease Domain of Lassa Virus Nucleoprotein Is Involved in Antigen-Presenting-Cell-Mediated NK Cell Responses. *J. Virol.* **88**, 13811–13820 (2014).
 258. Günther, S. *et al.* Antibodies to Lassa virus Z protein and nucleoprotein co-occur in human sera from Lassa fever endemic regions. *Med. Microbiol. Immunol.* **189**, 225–9 (2001).
 259. Ter Meulen, J. *et al.* Characterization of human CD4(+) T-cell clones recognizing conserved and variable epitopes of the Lassa virus nucleoprotein. *J. Virol.* **74**, 2186–92 (2000).
 260. Ter Meulen, J. *et al.* Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones. *Virology* **321**, 134–43 (2004).
 261. Pannetier, D. *et al.* Human dendritic cells infected with the nonpathogenic Mopeia virus induce stronger T-cell responses than those infected with Lassa virus. *J. Virol.* **85**, 8293–306 (2011).
 262. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146 (2003).
 263. Lloyd, G., Barber, G. ., Clegg, J. C. . & Kelly, P. Identification of Lassa fever virus infection with recombinant nucleocapsid antigen. *Lancet* **334**, 1222 (1989).
 264. Leifer, E., Gocke, D. J. & Bourne, H. Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. II. Report of a laboratory-acquired infection treated with plasma from a person recently recovered from the disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**, 677–9 (1970).
 265. Frame, J. D., Verbrugge, G. P., Gill, R. G. & Pinneo, L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 319–324 (1984).
 266. Jahrling, P. B. Protection of Lassa virus-infected guinea pigs with Lassa-immune plasma of guinea pig, primate, and human origin. *J. Med. Virol.* **12**, 93–102 (1983).
 267. McCormick, J. B., Webb, P. A., Krebs, J. W., Johnson, K. M. & Smith, E. S. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever. *J. Infect. Dis.* **155**, 437–44 (1987).
 268. Leski, T. A. *et al.* Testing and validation of high density resequencing microarray for broad range biothreat agents detection. *PLoS One* **4**, e6569 (2009).
 269. Fukuma, A. *et al.* Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* **55**, 44 (2011).
 270. Caballero, I. S. *et al.* Lassa and Marburg viruses elicit distinct host transcriptional responses early after infection. *BMC Genomics* **15**, 960 (2014).
 271. Panning, M. *et al.* Laboratory Diagnosis of Lassa Fever, Liberia. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1041–1043 (2010).
 272. Bausch, D. G. *et al.* Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent antibody test, and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2670–7 (2000).
 273. Emmerich, P. *et al.* Reverse ELISA for IgG and IgM antibodies to detect Lassa virus infections in Africa. *J. Clin. Virol.* **37**, 277–281 (2006).
 274. Hartnett, J. N. *et al.* Current and emerging strategies for the diagnosis, prevention and treatment of Lassa fever. *Future Virol.* **10**, 559–584 (2015).
 275. Meunier, D. Y., McCormick, J. B., Georges, A. J., Georges, M. C. & Gonzalez, J. P. Comparison of Lassa, Mobala, and Ippy virus reactions by immunofluorescence test. *Lancet (London, England)* **1**, 873–4 (1985).
 276. Shaffer, J. G. *et al.* Lassa fever in post-conflict sierra leone. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2748 (2014).
 277. El Mekki, A. A. & van der Groen, G. A comparison of indirect immunofluorescence and electron microscopy for the diagnosis of some haemorrhagic viruses in cell cultures. *J. Virol. Methods* **3**, 61–9 (1981).

278. Houlihan, C. & Behrens, R. Lassa fever. *BMJ* j2986 (2017). doi:10.1136/bmj.j2986
279. Stephen, E. L. & Jahrling, P. B. Experimental Lassa fever virus infection successfully treated with ribavirin. *Lancet (London, England)* **1**, 268–9 (1979).
280. Jahrling, P. B., Peters, C. J. & Stephen, E. L. Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys. *J. Infect. Dis.* **149**, 420–7 (1984).
281. Bausch, D. G., Hadi, C. M., Khan, S. H. & Lertora, J. J. L. Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as postexposure prophylaxis for Lassa fever. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1435–41 (2010).
282. Kochhar, D. M. Effects of exposure to high concentrations of ribavirin in developing embryos. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, S88–90 (1990).
283. Mire, C. E. *et al.* Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.* **23**, 1146–1149 (2017).
284. Oestereich, L. *et al.* Efficacy of Favipiravir Alone and in Combination With Ribavirin in a Lethal, Immunocompetent Mouse Model of Lassa Fever. *J. Infect. Dis.* **213**, 934–8 (2016).
285. Safronetz, D. *et al.* The broad-spectrum antiviral favipiravir protects guinea pigs from lethal Lassa virus infection post-disease onset. *Sci. Rep.* **5**, 14775 (2015).
286. Rosenke, K. *et al.* Use of Favipiravir to Treat Lassa Virus Infection in Macaques. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1696–1699 (2018).
287. Gowen, B. B. *et al.* Combinatorial ribavirin and interferon alfacon-1 therapy of acute arenaviral disease in hamsters. *Antivir. Chem. Chemother.* **17**, 175–83 (2006).
288. Uckun, F. M., Petkevich, A. S., Vassilev, A. O., Tibbles, H. E. & Titov, L. Stampidine prevents mortality in an experimental mouse model of viral hemorrhagic fever caused by lassa virus. *BMC Infect. Dis.* **4**, 1 (2004).
289. Uckun, F. M. *et al.* Zidampidine, an aryl phosphate derivative of AZT: in vivo pharmacokinetics, metabolism, toxicity, and antiviral efficacy against hemorrhagic fever caused by Lassa virus. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 3279–88 (2005).
290. Cashman, K. A. *et al.* Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral Res.* **90**, 70–79 (2011).
291. McCormick, J. B., Mitchell, S. W., Kiley, M. P., Ruo, S. & Fisher-Hoch, S. P. Inactivated Lassa virus elicits a non protective immune response in rhesus monkeys. *J. Med. Virol.* **37**, 1–7 (1992).
292. Fisher-Hoch, S. P. *et al.* Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glycoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 317–21 (1989).
293. Lukashevich, I. S. *et al.* A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J. Virol.* **79**, 13934–42 (2005).
294. Carrion, R. *et al.* A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine* **25**, 4093–102 (2007).
295. Cashman, K. A. *et al.* A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Hum. Vaccin. Immunother.* **13**, 2902–2911 (2017).
296. Cashman, K. A. *et al.* Enhanced Efficacy of a Codon-Optimized DNA Vaccine Encoding the Glycoprotein Precursor Gene of Lassa Virus in a Guinea Pig Disease Model When Delivered by Dermal Electroporation. *Vaccines* **1**, 262–77 (2013).
297. Jiang, X. *et al.* Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine* **29**, 1248–57 (2011).
298. Safronetz, D. *et al.* A recombinant vesicular stomatitis virus-based Lassa fever vaccine protects guinea pigs and macaques against challenge with geographically and genetically distinct Lassa viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003736 (2015).
299. Clegg, J. C. & Lloyd, G. Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guineapigs against Lassa fever. *Lancet (London, England)* **2**, 186–8 (1987).
300. Galan-Navarro, C. *et al.* Oxidation-sensitive polymersomes as vaccine nanocarriers enhance humoral responses against Lassa virus envelope glycoprotein. *Virology* **512**, 161–171 (2017).
301. Abreu-Mota, T. *et al.* Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa–Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat. Commun.* **9**, 4223 (2018).
302. Lukashevich, I. & S., I. Advanced Vaccine Candidates for Lassa Fever. *Viruses* **4**, 2514–2557 (2012).
303. Carrion Jr, R. *et al.* Vaccine Platforms to Control Arenaviral Hemorrhagic Fevers. *J. Vaccines Vaccin.* **03**, (2012).
304. Tomiyama, H., Takata, H., Matsuda, T. & Takiguchi, M. Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of

- CD27 and cytotoxic effector function. *Eur. J. Immunol.* **34**, 999–1010 (2004).
305. Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H. & Takiguchi, M. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.* **20**, 1189–1199 (2008).
306. Appay, V. *et al.* Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* **8**, 379–385 (2002).
307. Ogawa, L. M. & Vallender, E. J. Genetic substructure in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) on the island of Mauritius. *BMC Genomics* **15**, 748 (2014).
308. Madelain, V. *et al.* Favipiravir Pharmacokinetics in Nonhuman Primates and Insights for Future Efficacy Studies of Hemorrhagic Fever Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
309. 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.* **15**, 1292–1299 (2015).
310. Chatzizisis, Y. S., Misirli, G., Hatzitolios, A. I. & Giannoglou, G. D. The syndrome of rhabdomyolysis: Complications and treatment. *Eur. J. Intern. Med.* **19**, 568–574 (2008).
311. Holt, S. G. & Moore, K. P. Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med.* **27**, 803–11 (2001).
312. Cournac, J. M. *et al.* Rhabdomyolysis in Ebola Virus Disease. Results of an Observational Study in a Treatment Center in Guinea. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 19–23 (2016).
313. Vernet, M.-A. *et al.* Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea. *JCI insight* **2**, e88864 (2017).
314. Cressman, D. E. *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379–83 (1996).
315. Maruo, N., Morita, I., Shirao, M. & Murota, S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* **131**, 710–4 (1992).
316. Rollin, P. E., Bausch, D. G. & 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.* **196**, S364–S371 (2007).
317. Jain, V. V., Gupta, O. P., Jajoo, S. U. & Khiangate, B. Hypokalemia induced rhabdomyolysis. *Indian J. Nephrol.* **21**, 66 (2011).
318. Francis, J. L. & Armstrong, D. J. Acquired dysfibrinogenaemia in liver disease. *J. Clin. Pathol.* **35**, 667–72 (1982).
319. Daugan, M. *et al.* Type I Interferon Impairs Specific Antibody Responses Early during Establishment of LCMV Infection. *Front. Immunol.* **7**, 564 (2016).
320. Lazzarini, R. A., Keene, J. D. & Schubert, M. The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* **26**, 145–54 (1981).
321. Dutko, F. J., Wright, E. A. & Pfau, C. J. The RNAs of Defective Interfering Pichinde Virus. *J. Gen. Virol.* **31**, 417–427 (1976).
322. Ziegler, C. M. *et al.* The Lymphocytic Choriomeningitis Virus Matrix Protein PPXY Late Domain Drives the Production of Defective Interfering Particles. *PLOS Pathog.* **12**, e1005501 (2016).
323. Rose, C., Parker, A., Jefferson, B. & Cartmell, E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **45**, 1827–1879 (2015).
324. Grünfeld, J.-P. Glucocorticoids in Blood Pressure Regulation. *Horm. Res.* **34**, 111–113 (1990).
325. Donaudy, F. *et al.* Nonmuscle Myosin Heavy-Chain Gene MYH14 Is Expressed in Cochlea and Mutated in Patients Affected by Autosomal Dominant Hearing Impairment (DFNA4). *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 770–776 (2004).
326. Chistiakov, D. A., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Myeloid dendritic cells: Development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Immunobiology* **220**, 833–844 (2015).
327. Baize, S. *et al.* Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 163–168 (2002).
328. Chan, J. K. *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. *J. Clin. Invest.* **122**, 2711–2719 (2012).
329. Wauquier, N., Becquart, P., Padilla, C., Baize, S. & Leroy, E. M. Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, (2010).
330. Papa, A. *et al.* Cytokines as biomarkers of Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* **88**, 21–27 (2016).
331. Furie, M. B. & Randolph, G. J. Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.* **146**, 1287–301 (1995).
332. Mukaida, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int. J. Hematol.* **72**, 391–8 (2000).
333. McNally, J. M. *et al.* Attrition of Bystander CD8

- T Cells during Virus-Induced T-Cell and Interferon Responses. *J. Virol.* **75**, 5965–5976 (2001).
334. Kamphuis, E., Junt, T., Waibler, Z., Forster, R. & Kalinke, U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood* **108**, 3253–61 (2006).
335. Jiang, J., Lau, L. L. & Shen, H. Selective depletion of nonspecific T cells during the early stage of immune responses to infection. *J. Immunol.* **171**, 4352–8 (2003).
336. Grewal, I. S. & Flavell, R. A. The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol. Res.* **16**, 59–70 (1997).
337. Shao, Z., Sun, F., Koh, D. R. & Schwarz, H. Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. *Mol. Immunol.* **45**, 3990–3999 (2008).
338. McElroy, A. K. *et al.* Ebola hemorrhagic Fever: novel biomarker correlates of clinical outcome. *J. Infect. Dis.* **210**, 558–66 (2014).
339. Henn, V., Steinbach, S., Büchner, K., Presek, P. & Kroczeck, R. A. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* **98**, 1047–54 (2001).
340. Russell, J. H. & Ley, T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 323–370 (2002).
341. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* **14**, 1212–1218 (2013).
342. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
343. Ruibal, P. *et al.* Unique human immune signature of Ebola virus disease in Guinea. *Carolina Nanclares* **26**, 11400 (2016).
344. Oestereich, L. *et al.* Chimeric Mice with Competent Hematopoietic Immunity Reproduce Key Features of Severe Lassa Fever. *PLOS Pathog.* **12**, e1005656 (2016).
345. Remy, M. M. *et al.* Interferon- γ -Driven iNOS: A Molecular Pathway to Terminal Shock in Arenavirus Hemorrhagic Fever. *Cell Host Microbe* **22**, 354–365.e5 (2017).
346. Zapata, J. C. *et al.* Transcriptome Analysis of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Exposed to Lassa Virus and to the Attenuated Mopeia/Lassa Reassortant 29 (ML29), a Vaccine Candidate. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2406 (2013).
347. Yen, J. Y. *et al.* Therapeutics of Ebola Hemorrhagic Fever: Whole-Genome Transcriptional Analysis of Successful Disease Mitigation. *J. Infect. Dis.* **204**, S1043–S1052 (2011).
348. Rubins, K. H. *et al.* The temporal program of peripheral blood gene expression in the response of nonhuman primates to Ebola hemorrhagic fever. *Genome Biol.* **8**, R174 (2007).
349. Fedeli, C. *et al.* Axl Can Serve as Entry Factor for Lassa Virus Depending on the Functional Glycosylation of Dystroglycan. *J. Virol.* **92**, (2018).
350. Lieberman, J. Granzyme A activates another way to die. *Immunol. Rev.* **235**, 93–104 (2010).
351. Glas, J. *et al.* The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn’s disease. *PLoS One* **6**, e29309 (2011).
352. Uede, T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathol. Int.* **61**, 265–80 (2011).
353. O’Regan, A. W., Hayden, J. M. & Berman, J. S. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 495–502 (2000).
354. Naba, A., Clauser, K. R., Lamar, J. M., Carr, S. A. & Hynes, R. O. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. *Elife* **3**, e01308 (2014).

Annexes

Anticorps	Ref	Fournisseur
CD56 BV421	560360	BD
CD3 BV510	560770	BD
CD45 FITC	557803	BD
CD10 PE	557143	BD
CD20 PC7	560735	BD
CD4 700	560836	BD
CD8 APC H7	641400	BD
CD45 BV421	561291	BD
CD56 PE	555516	BD
Ki67 PC7	561283	BD
CD4 APC	551980	BD
GrzB 700	560213	BD
CD3 BV421	560351	BD
CD45 BV510	563530	BD
CD28 PECF594	562296	BD
CD27 FITC	555440	BD
CD45RA PC7	561216	BD
CD95 APC	558814	BD
CD4 BV421	560811	BD
CD161 PE	556081	BD
IL17A PERCP5,5	560799	BD
CD25 APCH7	560225	BD
CD80 BV510	563084	BD
CD40 PE	558835	BD
CD45 CF594	562394	BD
CD27 APC	561400	BD
CD3 APCH7	557757	BD
CD83 CF594	562631	BD
CD69 PERCP5,5	560738	BD
CD90 BV510	563070	BD
CD34 CF594	562449	BD
CD2 APC	560642	BD
CD3 APC	557597	BD
CD20 APC	560900	BD
CD56 APC	555518	BD
CD8 APC	561421	BD
CD45 700	561288	BD
CD11c BV510	744435	BD
CD141 PE	559781	BD
CD123 PerCP Cy5,5	558714	BD
CD8 APC-H7	560662	BD
CD28 v450	561397	BD
CD14 Alexa 700	557923	BD
CD20 APC H7	560853	BD
CD69 PE Cy7	560712	BD
CD45RO FITC	555492	BD
CD150 PE	559592	BD
CD41 APC H7	561422	BD
CD42b APC	551061	BD
CD123 PE Cy7	560826	BD
CD83 PE Cy5	551058	BD
CD137 PE Cy5	551137	BD
CD152 PE Cy5	555854	BD

Anticorps	Ref	Fournisseur
NKp80 APC	130-094-845	Miltenyi
HLADR FITC	130-095-295	Miltenyi
CD154 PE	130-092-289	Miltenyi
CD127 PC7	130-099-719	Miltenyi
FOXP3 APC	130-093-013	Miltenyi
CD1c FITC	130-090-507	Miltenyi
CD33 BV421	130-099-486	Miltenyi
CD16 PerCPvio700	130-106-708	Miltenyi
CD16 Vioblue	130-106-702	Miltenyi
CD14 APC	130-113-143	Miltenyi
CD14 Viogreen	130-113-153	Miltenyi
CD14 PEvio615	130-107-196	Miltenyi
CD303 PC7	130-096-744	Miltenyi
HLADR APCvio7	130-104-200	Miltenyi
CD86 Vioblue	130-100-100	Miltenyi
CD16 APC	130-106-705	Miltenyi
HLA-DR PEvio770	130-104-111	Miltenyi
CD1c FITC	130-090-507	Miltenyi
CD66abce PE	130-093-133	Miltenyi
CD303 APC	130-090-905	Miltenyi
CD279 CF594	329940	Biolegend
CD137 PC7	309818	Biolegend
CCR7 PC5	353220	Biolegend
CD279 FITC	329904	Biolegend
ANNEXIN5 PE	640908	Biolegend
7AAD	420404	Biolegend
CD135 PC5	313310	Biolegend
CD41 700	303728	Biolegend
CD49f APCH7	313628	Biolegend
CD14 CF594	301852	Biolegend
HLAabc 700	311438	Biolegend
HLA-abc APC H7	311426	Biolegend
CD34 pacific blue	343512	Biolegend
Perforin FITC	3465-7	MABTECH
CD38 FITC	60131FI	Stemcell

Références des anticorps de cytométrie en flux utilisés au cours de la thèse

Articles publiés ou soumis :

Nicolas Baillet, Sophie Krieger, Pierre Olivier Vidalain, Xavier Carnec, Alexandra Fizet, Mathieu Mateo, Valérie Caro, Frédéric Tangy, Sylvain Baize. **Screening of Lassa and Mopeia virus Z matrix protein interactors reveals a positive role for the E3 ligase ITCH and autophagy machinery in the release of infectious particles.** *En révision à Journal of Virology.*

Stéphanie Reynard, Alexandra Journeaux, Emilie Gloaguen, Justine Schaeffer, Hugo Varet, Natalia Pietrosemoli, Mathieu Mateo, Nicolas Baillet, Cédric Laouenan, Hervé Raoul, Jimmy Mullaert, Sylvain Baize. **Immune parameters and outcome during Ebola virus disease.** *En révision à JCI insights.*

Mathieu Mateo, Xavier Carnec, Stéphanie Reynard, Alexandra Journeaux, Nicolas Baillet, Justine Schaeffer, Caroline Picard, Catherine Legras-Lachuer, Richard Allan, Emeline Perthame, Kenzo-Hugo Hillion, Natalia Pietrosemoli, Marie-Agnès Dillies, Laura Barrot, Audrey Vallve, Stéphane Barron, Cathy Boehringer, Jean Armengaud, Jean-Charles Gaillard, Caroline Carbonnelle, Hervé Raoul, Frédéric Tangy, Sylvain Baize. **Early and robust T-cell responses against Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein correlate with complete protection in non-human primates immunized with a single shot of different Lassa fever vaccines.** *En soumission.*

Nicolas Baillet, Sylvain Baize. **S'armer contre la fièvre de Lassa.** *Publié dans Biofutur, 384, 38-39. 2017.*

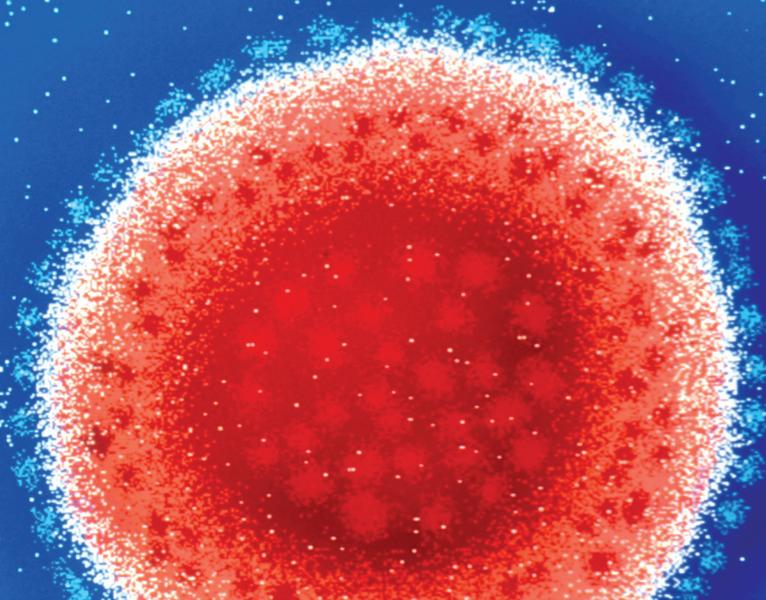




TERRORISME

Connaître et maîtriser les risques radiologique, biologique et chimique

La menace terroriste plane aujourd'hui sur un grand nombre de pays, développés ou en développement. Malgré la convention internationale d'interdiction des armes chimiques, ces dernières continuent à être largement employées, comme en témoigne le récent bombardement au sarin perpétré par l'armée syrienne sur des positions rebelles, faisant 80 victimes civiles. Le terrorisme non conventionnel (NRBC) sera-t-il la prochaine étape de l'évolution du terrorisme mondial, son nouveau visage ? Les équipes de plusieurs centres de recherche, en France et ailleurs, développent des solutions pour analyser et se préparer à une telle éventualité.



S'armer contre la fièvre de Lassa

La récente épidémie de maladie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest est l'exemple de la menace que représentent les fièvres hémorragiques virales (FHV) pour la santé publique, mais également sur les plans économique et politique. La fièvre de Lassa est l'une des FHV les plus inquiétantes de par sa prévalence. Il est donc urgent de mieux comprendre cette maladie pour laquelle nous manquons de moyens de lutte.

© VEM/BSIP

Les auteurs

Nicolas Baillet et Sylvain Baize

Unité de Biologie des infections virales émergentes, Institut Pasteur, Lyon
Centre international de recherche en infectiologie, Inserm, CNRS, ENS Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon

L'agent étiologique de la fièvre de Lassa (FL), zoonose endémique en Afrique de l'Ouest, est le virus Lassa (LASV), appartenant à la famille des Arenaviridae et identifié pour la première fois en 1969 lors d'une épidémie sur le plateau de Jos, au Nigéria (1). Les pays les plus touchés sont le Nigéria, le Libéria, la Sierra Léone et la Guinée mais la présence du LASV a été détectée dans les pays limitrophes (Mali,

Côte d'Ivoire, Bénin et Ghana), démontrant le caractère expansif de la maladie. La FL est responsable de plus de 300 000 cas et de plus de 5 000 décès annuels (2). D'autres Arenavirus sont responsables de FHV en Amérique du Sud et le virus Lujo a récemment émergé en Afrique Australe, avec un taux de mortalité de 80 %, démontrant le potentiel d'émergence que présentent ces virus (3). Il n'existe à ce jour ni traitement réellement efficace ni vaccin contre la FL, dont la mortalité a dépassé 30 % au cours de la dernière épidémie au Nigeria, en 2015. De plus, le diagnostic souvent tardif de l'infection et la similitude du tableau clinique avec d'autres endémies plus fréquentes dans ces régions (paludisme, fièvre jaune, dysenterie...) empêchent la mise en place du seul moyen de contrôle de l'épidémie disponible sur le terrain : l'isolement des patients.

Un grand nombre d'infections par le LASV sont asymptomatiques. Les autres formes de la maladie se manifestent chez envi-

ron 20 % des patients, avec une sévérité très variable allant d'une forme modérée à une forme fatale associée à des manifestations hémorragiques et à une défaillance multiviscérale (4). Vomissements, diarrhées et douleurs abdominales sont observés dans les cas plus sévères de la maladie. Des œdèmes faciaux et des hémorragies muco-sales sont indicatifs d'un pronostic fatal. Chez les survivants, la guérison survient après 10 à 15 jours mais elle est associée à une surdité pouvant être permanente chez un tiers des patients (5). La FL est par ailleurs particulièrement sévère chez la femme enceinte avec un avortement spontané quasi-systématique et un taux de mortalité maternelle très élevé (6).

Pour toutes ces raisons, LASV fait partie du groupe à risque 4, la classe des agents pathogènes les plus dangereux. LASV est également identifié comme agent potentiel du bioterrorisme (7). Il est important d'ajouter à ce tableau que la FL est une maladie négligée, frappant des pays en développement, avec des structures de

Depuis 2004, le laboratoire P4 Jean Mérieux est sous la responsabilité de l'Inserm, qui l'a réorganisé pour en faire une infrastructure de recherche de classe mondiale ouverte à l'ensemble de la communauté scientifique internationale. Ce laboratoire de sécurité maximale, totalement hermétique et en dépression d'air, est constitué de sas de décontamination et de portes étanches. Les chercheurs y travaillent sous poste de sécurité microbiologique et sont revêtus d'un scaphandre en pression positive relié à des narguilés fournissant de l'air dont le renouvellement est totalement indépendant du laboratoire.



© INSERM/F. GUÉNET

soins précaires et une stabilité sociale et politique souvent fragile. L'industrie pharmaceutique ne montre donc pas d'intérêt pour cette maladie qui frappe des pays non solvables ne représentant qu'un marché limité. Seules quelques équipes dans le monde s'intéressent à la FL, principalement à cause de la difficulté d'accès aux patients et des conditions de sécurité drastiques liées à la manipulation des agents pathogènes de classe 4. Il est donc urgent d'améliorer nos connaissances et de trouver des moyens de lutte contre cette maladie.



© V. MOTYÁKA

DE L'AMÉLIORATION DES CONNAISSANCES...

Les réponses immunitaires et les mécanismes pathologiques qui surviennent lors de la FL sont encore inconnus. On ignore en particulier les mécanismes clés qui orientent la maladie vers la survie ou la mort du patient. C'est à cette problématique que l'unité de Biologie des infections virales émergentes de l'Institut Pasteur de Lyon, spécialisée dans la FL depuis plus de 15 ans, tente d'apporter des réponses. Unité qui est d'ailleurs la seule de l'Institut à être basée à Lyon en raison de la présence du laboratoire P4 Jean Mérieux - Inserm, un des rares laboratoires en Europe où il est possible de travailler sur un virus aussi dangereux. Dans un projet ambitieux financé par le programme ASTRID (Accompagnement spécifique des travaux de recherches et d'innovation défense) de l'Agence nationale de la recherche, faisant l'objet d'une thèse cofinancée par la Direction générale de l'armement et l'Institut Pasteur, les chercheurs de l'unité s'intéressent activement à l'impact de l'infection par LASV sur l'organisme et les différentes réponses mises en place par le système immunitaire pour se défendre, ainsi qu'à la corrélation des phénomènes observés avec la gravité de la maladie. Le but est d'identifier des marqueurs précoces de l'infection prédictifs de la gravité de la maladie afin d'optimiser son diagnostic et la gestion des épidémies sur le terrain. Ce projet permettra de mieux comprendre les interactions virus-hôte et aidera au développement d'approches thérapeutiques et vaccinales.

... AUX AVANCÉES CONCRETES

Cette étude intégrée utilise des technologies de pointe en biologie avec des approches *in vivo* et ce, à plusieurs niveaux. Du génome à la cellule et jusqu'à l'organisme dans sa complexité, chaque événement pouvant être perturbé par l'infection au cours de la FL est traqué. Les résultats préliminaires suggèrent que l'issue de la maladie serait déterminée dès les premiers jours après l'infection, soit avant même l'apparition des symptômes. Les paramètres cliniques du modèle *in vivo* élaboré par les chercheurs, comprenant sévérité des symptômes (température, paramètres de coagulation...) et données biochimiques et hématologiques, diffèrent fortement en fonction de la gravité de la maladie, dès les premiers jours qui suivent l'infection. Certains de ces marqueurs, notamment les paramètres mesurant les atteintes rénales, sont anormalement exprimés dans les cas graves de FL uniquement. Ces paramètres peuvent d'ores et déjà constituer des marqueurs prédictifs de la gravité de la FL.

Concernant la dynamique du LASV, les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent une corrélation positive entre la durée de persistance de virus infectieux dans le sang et la sévérité de la maladie. Le LASV infecte la plupart des tissus mais il est majoritairement retrouvé dans les organes lymphoïdes (ganglions et rate), impliqués dans les réponses immunitaires. Ces organes constituent donc le principal site de réplication du virus, avant sa dis-

sémination vers les autres tissus. Il reste maintenant à déterminer quelles cellules, dans quel tissu, sont responsables des premiers cycles de réplication virale *in vivo*.

La réponse immunitaire se retrouve également fortement modulée au cours de la FL. Les cas peu sévères n'entraînent pas de perturbations importantes de l'inflammation. En revanche, une activation précoce des lymphocytes B, T et NK, suivie d'une augmentation de leur nombre, est corrélée à un contrôle de la réplication du LASV et à la survie du modèle. Les lymphocytes cytotoxiques (LTC8), majoritairement impliqués dans la suppression sélective des cellules infectées, se sont avérés être particulièrement impliqués dans cette réponse à l'infection contre le LASV, avec une forte prolifération des cellules, une activation marquée et précoce, une forte activité toxique et une apparition plus tardive de lymphocytes cytotoxiques mémoires, véritables effecteurs de l'immunité à long terme. Ces observations démontrent ainsi l'importance d'une réponse immunitaire puissante et précoce pour contrer l'infection par le LASV.

L'étude des événements pathogéniques au cours de la FL permettra d'apporter des réponses à des questions non élucidées depuis plus de 20 ans ainsi que des armes pour contrer cette menace. Elle permettrait également d'améliorer les connaissances concernant d'autres FHV, qui partagent nombre de mécanismes protecteurs ou physiopathologiques. ■

Le principal réservoir du LASV est le rat du Natal (*Mastomys natalensis*), qui vit à proximité des habitations (8). La transmission se fait par contact direct via l'exposition aux fluides de l'animal (urine, salive, sang...), voire par la chasse et la consommation du rongeur. Les fèces de ce dernier représentent aussi un risque élevé pour la transmission du virus à l'homme par aérosolisation. La transmission interhumaine survient ensuite par contact avec les fluides biologiques, souvent dans un contexte nosocomial (9). La transmission de l'animal à l'homme serait responsable de 80 % des cas de FL. On estime que 5 à 20 % des *M. natalensis* d'Afrique de l'Ouest sont porteurs du LASV. La précarité des infrastructures et le manque d'équipements dans ces régions facilitent la colonisation par le rongeur, augmentant la fréquence des contacts avec l'homme (10). Il serait donc possible de lutter contre la FL en limitant ces contacts, notamment en améliorant la qualité de construction des habitations pour empêcher leur colonisation ou en utilisant des moyens de dératisation.

- (1) Frame JD et al. (1970) *Am J Trop Med Hyg* 19, 670-6
- (2) Ogbu O et al. (2007) *J Vector Borne Dis* 44, 1-11
- (3) Paweska JT et al. (2009) *Emerg Infect Dis* 15, 1598-602
- (4) Edington GM et al. (1972) *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 66, 381-9
- (5) Cummins D et al. (1990) *J Am Mes Assoc* 16, 2093-6
- (6) Gunther S, Lenz O (2004) *Crit Rev Clin Lab Sci* 41, 339-90
- (7) Borio L et al. (2002) *J Am Mes Assoc* 18, 2391-405
- (8) McCormick JB et al. (1987) *J Infect Dis* 155, 437-45
- (9) Fisher-Hoch SP et al. (1995) *BMJ* 311, 857-9
- (10) Bonwitt J et al. (2017) *Am J Trop Med Hyg*, doi:10.4269/ajtmh.16-0675